Beiträge zur Kenntnis der Organismen im Eichenschleimfluß.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

genehmigt

von der philosophischen Fakultät

der

Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin.

Von

Ludwig Rose,
Frankfurt a. M.

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

Tag der Promotion: 15. Juni 1910.

168

Referenten:
Professor Dr. Schwendener.
Professor Dr. Engler.

Mit Genehmigung der hohen Fakultät kommt hier nur der Text der Arbeit zum Abdruck. Die ganze Arbeit mit den dazu gehörigen Tafeln wird in der „Wochenschrift für Brauerei" erscheinen.

Berlin 1910.
Druck von Gebr. Unger in Berlin SW., Bernburger Str. 30.

Der Endomyces Magnusii Ludwig.

(Oidium Ludwigii Hansen.)

Der Endomyces Magnusii wurde zuerst von Ludwig 1886 im gärenden Schleimfluß von Greizer Eichen gefunden. Er beschreibt ihn (1, 2, 3, 4) auf Grund direkter mikroskopischer Untersuchungen des Schleimflusses als Hyphomyceten mit viersporiger Askenfruktifikation, exogener und endogener (akzessorischer) Oidienbildung und kräftigem Gärvermögen und glaubt anfangs auch an einen Zusammenhang mit den dabei gefundenen Hefen, eine Vermutung, die er aber selbst, bald nachdem die ersten genaueren Untersuchungen vorlagen, als irrtümlich aufgab. Danach wurde dieser Pilz des öfteren von verschiedenen Seiten und zum Teil mit sehr verschiedenen Resultaten bearbeitet und beschrieben. Es dürfte angebracht sein, zunächst einen kurzen Überblick nur über die wichtigsten vorliegenden Arbeiten zu geben und dann erst auf die Einzelheiten näher einzugehen. Weitere Literaturangaben finden sich in dem am Schluß der Arbeit beigegebenen Verzeichnis, in dem sämtliche mir bekannten Arbeiten über Schleimflußvegetationen angeführt sind. Sie sind zum großen Teil einem Verzeichnis entnommen, das mir Herr Hofrat Prof. Ludwig zur Verfügung gestellt hatte.

I. Übersicht über die Literatur.

Emil Chr. Hansen hat 1889 an einigen Eichen bei Kopenhagen die gleiche Erscheinung beobachtet (1), fand aber nur in einem der untersuchten Fälle einen Pilz, der dem von Ludwig beschriebenen ähnlich war. Er bezweifelt deshalb die Ansicht Ludwigs, daß die Krankheit durch den Pilz hervorgerufen werde und infektiösen Charakter habe. Diese Frage wurde eingehender 1889 von Holtz (1) bearbeitet, der versuchte, das Eindringen von Pilzelementen durch direkte Unter-

suchungen der beschädigten Rinde nachzuweisen. Er konnte aber weder Teile des Endomyces noch irgend welche der im Schleimfluß reichlich vorhandenen Bakterien innerhalb des Gewebes auffinden. Es besteht also die Auffassung, daß die Schleimflußvegetationen als sekundäre Erscheinungen auftreten, wenn primär durch Verletzung irgend welcher Art das Austreten von Saft veranlaßt ist. Nach den Beobachtungen Ludwigs erscheint es aber zweifellos, daß wiederum als Folge der Gärung eine weitere Zerstörung der Rinde stattfindet. In jahrelanger Beobachtung konnte er die stetige Vergrößerung der Gärungsherde und das Schwinden der umgebenden Rinde feststellen in demselben Sinne, wie er es in seiner ersten Veröffentlichung an Hand einer schematischen Zeichnung für die ersten drei Jahre bereits erläutert hat. Nach den Holtzschen Untersuchungen bleibt nur die Erklärung möglich, daß es sich weniger um Angriffe der Pilzelemente auf gesunde Zellen handelt, als vielmehr um die rein chemische Wirkung der Produkte der Gärung oder der dabei in Tätigkeit gesetzten Enzyme.

Bezüglich der in den Schleimflüssen vorkommenden Organismen konnte Hansen (1) nur in einem Fall das Auftreten des Mycels und der Oidien des von Ludwig beschriebenen Endomyces feststellen. Es gelang ihm auch, den Pilz zu isolieren, aber niemals, weder im frischen Material noch in künstlichen Kulturen, bekam er die Fruktifikation zu Gesicht. Ludwig (8) wiederholte, daß die Askenfruktifikation zu dem Oidium gehört und empfahl den Rat Brefelds, den Zusammenhang von der höheren Fruchtform (Askospore) ausgehend festzustellen. Bald darauf gelang es Brefeld (1) bei Untersuchungen von Material, das Ludwig ihm geschickt hatte, dessen Beobachtungen zu bestätigen und auch im Laboratorium die Sporulation herbeizuführen. Als nun Hansen (4) nach häufigen Untersuchungen und Wiederholung der Versuche Brefelds niemals Sporen, aber zum Unterschied von Brefeld eine beträchtliche Gärung feststellen konnte, unterschied er seinen Pilz als Oidium Ludwigii Hansen von dem Endomyces Magnusii Ludwig. Ganz ähnliche Resultate erhielt Holtz, der bei der Untersuchung von Karlsruher Eichen denselben Pilz fand und die Beobachtungen Hansens im wesentlichen bestätigte. In neuester Zeit hat sich Guillermond (1) wieder mit der Frage beschäftigt, und es ist ihm gelungen, an Material, das ihm von Ludwig zur Verfügung gestellt war, in Kulturen auf Karottenscheiben sporenreife Asken zu erhalten, allerdings nur in einer geringen Zahl (3 pCt.) der sehr zahlreich angestellten Versuche. Ich muß vorweg nehmen, daß ich auf Grund der vorliegenden Literatur und eigener vergleichender Untersuchungen zu der Überzeugung gekommen bin, daß es sich bei

dem Endomyces Magnusii Ludwig und Oidium Ludwigii Hansen um einen und denselben Pilz handelt. Ich hatte zum Vergleich mit den sechs von mir an verschiedenen Eichen in der Umgebung Berlins gefundenen Stämmen eine Kultur, die aus Greizer Material von Dr. P. Claussen (Berlin) isoliert war, und den ebenfalls aus Greiz herrührenden Stamm, bei dem Guillermond vor kurzem die Fruktifikation bekommen hat. Bei dem letzteren handelte es sich zweifellos um den Endomyces Magnusii. Da sich diese acht Kulturen bei allen damit angestellten Versuchen morphologisch und physiologisch völlig gleich verhielten und ferner durch eingehende Nachprüfung der von Hansen und Holtz gemachten Angaben die Identität meiner Pilze mit den von ihnen als Oidium Ludwigii beschriebenen zur Genüge festgestellt erscheint, so ist es für mich außer Frage, daß in allen besprochenen Fällen der Endomyces Magnusii vorgelegen hat. Das Ausbleiben der Fruktifikation im Laboratorium hat zweifellos nur darin seinen Grund, daß es bisher nicht gelungen ist, die für diese Vegetationsform des Pilzes nötigen Kulturbedingungen zu schaffen; es liegt darin aber kein ausreichender Grund, ihm deshalb die Benennung nach dieser höheren Fruchtform abzusprechen; denn diese ist durch die übereinstimmenden Beobachtungen von Ludwig, Brefeld und Guillermond einwandfrei nachgewiesen.

II. Vorkommen.

Nach den Angaben Ludwigs kommt der Endomyces Magnusii nur in dem typischen weißen Schleimfluß von Eichen vor. Hier allerdings mit größter Regelmäßigkeit. Er hat ihn von 1884 bis jetzt in jedem Jahr von Mitte Juni bis gegen Ende August beobachten können. 1889 wurde er von Hansen bei Kopenhagen beobachtet, wenngleich lange nicht in der Üppigkeit, wie Ludwig beschreibt. 1900 wurde er sehr häufig neben anderen Saftflüssen von Holtz in Karlsruhe aufgefunden, und im Jahre 1908 gelang es mir, ihn verschiedentlich aus dem allerdings spärlich auftretenden Gärungsschaum von Berliner Eichen zu isolieren. Ich selbst fand ihn an vier Eichen an verschiedenen Stellen des Grunewalds und an einer Eiche bei Dahlem. Ferner stand mir eine Probe zur Verfügung, die Herr Dr. Sauer aus Potsdam übersandt hatte. An allen diesen Eichen, die den von Ludwig beschriebenen typischen weißen Schleimfluß zeigten, war jedesmal auch neben anderen Organismen der Endomyces Magnusii, wenn nicht sehr üppig, so doch ziemlich reichlich vorhanden. Es handelt sich also um einen weitverbreiteten Pilz, der im Gegensatz zu den wechselnd auftretenden Schimmelpilzen und

Algen für den typischen weißen Eichenschleimfluß charakteristisch ist, und dessen Fehlen in solchen Fällen nur zweimal von Hansen konstatiert wurde. Dabei bleibt es aber noch fraglich, ob hier wirklich der typische weiße Schleimfluß vorgelegen hat.

Die Probenahme erfolgte zum Teil in der Weise, daß vermittels eines Glasstäbchens der Gärungsschaum auf steriles Filtrierpapier gebracht und dieses am folgenden Tag in Würze gegeben wurde oder in der Weise, daß das Material in ein steriles Gläschen gebracht wurde in dessen Korken zur Entnahme der Probe ein Stückchen Draht eingelassen war. Es wurden dann von der in Gärung geratenen Würze bzw. von dem in Wasser aufgeschwemmten Material in vier bis fünf verschiedenen Verdünnungen Pinselstriche auf Würzegelatineplatten gemacht und sobald sich die Kolonien entwickelt hatten, die verschieden aussehenden auf kleine Würzefläschchen weiter geimpft. Um eventuell auch solche Organismen aufzufinden, für die die Würze kein geeigneter Nährboden war, wurden nebenbei auch einzelne Proben auf Kirschsaft, Eichenrindendekokt und Fleischsaft gegeben; wesentliche Unterschiede haben sich dabei nicht ergeben. Zur genaueren Untersuchung wurden jedesmal Reinkulturen nach der Lindnerschen Methode hergestellt, indem die Aufschlämmung des Pilzes mit Würze soweit verdünnt wurde, bis es gelang, in den damit angelegten Tröpfchenkulturen einzelne Tropfen aufzufinden, die nur eine einzige Zelle enthielten. Bei dem Endomyces Magnusii wurde hierbei von einer einzelnen Oidie ausgegangen.

III. Morphologie.

1. Vegetative Formen.

Der Endomyces Magnusii kommt in drei charakteristischen Formen vor. 1. Das Mycel beschreibt Ludwig als charakterisiert durch vorwiegend unilaterale Verzweigung mit sehr konstanter regelmäßiger Anordnung der Querwände. Die Zellen der Hauptäste haben gewöhnlich eine Länge von 50—70 μ und einen Durchmesser von 8—10 μ, doch kommen sehr bedeutende Schwankungen vor, wobei der Durchmesser der Hyphen nicht nur zwischen 4 und 9 μ schwankt, sondern sogar in einzelnen Fällen die unverhältnismäßig geringe Dicke von 2,5 μ erreicht. 2. Die Spalthefenform, abgerundete, längliche Rechtecke, etwa 6—22 μ, die sich strecken und durch Querwände teilen, wobei sie lebhaft an die Vermehrungsart der Schizosaccharomyceten erinnern. 3. Eiförmige Oidien mit mehr oder weniger körnigem Plasma, in

fortgeschrittenem Stadium mit einem bis mehreren Fetttröpfchen zum Teil mit stark verdickter, aber immer einfacher Membran mit einem größten Durchmesser von 11—17 μ.

Das Wachstum in Bierwürze vollzieht sich in der Weise, daß die starkwandige Oidie etwas anschwillt und an beliebiger Stelle dann einen kleinen Buckel bildet, der zum Keimschlauch auswächst. Ein Platzen der Membran der Mutterzelle war nicht zu beobachten. Es folgt dann das Auftreten von Querwänden; in Ausnahmefällen wird noch ein zweiter Keimschlauch angelegt; sehr bald, manchmal schon vor der ersten Querwand, tritt Verzweigung ein. Charakteristisch ist, wie Ludwig schon hervorgehoben hat, die Verzweigung scharf unterhalb einer Querwand und die Stellung der den Seitensproß abgrenzenden Querwand im spitzen Winkel zum Fadenverlauf (Abb. 17a).[1]) Daneben kommen, allerdings seltener, auch Formen wie b mit gerader Querwand und ganz unregelmäßige (wie c) vor, besonders in dicken Mycelflocken. Der Zerfall des Mycels vollzieht sich in der Weise, daß sich die einzelnen Zellen gegeneinander abrunden, sich trennen, unter geeigneten Verhältnissen sich wieder strecken, ganz wie Spalthefe eine Querwand bilden, wieder zerfallen und zum Schluß nach Erschöpfung des Nährsubstrates zu eiförmigen Oidien sich abrunden. Dieser Zerfall läßt sich besonders deutlich beobachten in Kulturen auf dünner Gelatineschicht am Deckgläschen. Man kann hier alle Stadien des Zerfalls an einem Präparat bekommen. An den äußersten Spitzen kräftig wachsendes Mycel, weiter hinten in längliche Konidien zerfallend, diese entweder wieder auskeimend oder sich zu Oidien abrundend und in der Mitte der Kultur nur noch fettreiche starkwandige Oidien. Es liegt hier also ganz zweifellos akropetaler Zerfall vor. Das Gegenteil konnten übereinstimmend Brefeld und Holtz feststellen, ersterer, indem er beobachtete, wie die unter einem Tropfen Nährgelatine gewachsenen Mycelien zerfielen, sobald sie die Oberfläche erreichten, letzterer, indem er die in Würze gewachsenen Mycelien in destilliertes Wasser brachte. Bei dieser Art der Versuchsanstellung konnte er noch eine dritte Art der Konidienbildung feststellen: indem nämlich an den Haupthyphen seitlich kleine Zweige entstanden und nach Sistierung ihres Längenwachstums auf die oben erwähnte Art Konidien bildeten. Es ist diese Art aber nur als eine Modifikation des zweiten Falles aufzufassen und keineswegs zu verwechseln mit der Art, wie z. B. bei Endomyces fibuliger die Hefekonidien gebildet werden. Welche Faktoren beim Mycelzerfall ausschlaggebend sind, ist

1) Die Zeichnungen sind sämtlich mit dem Zeißschen Zeichenprisma angefertigt, die Vergrößerungen für die einzelnen Fälle jedesmal bestimmt.

nicht einwandfrei festgestellt worden. Den Zerfall hinzuhalten scheinen Luftabschluß und tiefe Temperatur. Brefeld erhielt bei Kulturen unter Gelatine reines Mycel und Askosporen; ziemlich großes Mycel konnte ich auf diese Weise auch erhalten, dagegen trat auffallenderweise in Kulturen, die in Reagenzgläsern in Gelatine eingeschmolzen waren, trotz des völligen Luftabschlusses vollständiger Zerfall ein; desgleichen bestehen die feinen Ästchen der Stichkultur in Gelatine und das scheinbare Mycelgewirr unter der Gelatineoberfläche bei Riesenkolonien rein aus Oidien; dabei sind nach dem Zerfall des ursprünglichen großen Mycels durch Auskeimen der gebildeten Oidien kleine, höchstens sechszellige Mycelien entstanden, die nun auch wieder zerfallen sind, oder die Spalthefekonidien haben sich als solche noch einige Male vermehrt, so daß der ursprüngliche Fadenverlauf durch eine vier- bis achtfache Reihe von Oidien bezeichnet und makroskopisch sichtbar wird. In großen Mengen findet sich Mycel neben Oidien und Spalthefeformen im Bodensatz vergorener Würze; in größeren Gefäßen bildete dieser manchmal, aber keineswegs regelmäßig, eine schleimige Masse, aus der sich bei der Probenahme bis zu dezimeterlange Fäden ausziehen ließen. Es war hier also infolge der geringen Sauerstoffspannung nur ein relativ kleiner Teil zerfallen, wogegen in Tröpfchenkulturen, also bei reichlichem Luftzutritt, regelmäßig ein restloser Zerfall eingetreten war. Das vollzog sich allerdings bei 17—20° erst viel langsamer, wie bei Optimaltemperatur (28°), und besonders in Würzefläschchen war bei dieser tieferen Temperatur ein Überwiegen der Mycelbildung wahrzunehmen. Ferner hat es sich herausgestellt bei den Versuchen über den Einfluß verschiedener Gifte auf das Wachstum, daß durch Zusätze von Soda ebenso wie durch Zitronensäure fast reines Mycel zu erhalten war. Diese Tatsache bestätigte sich, als die Versuche mit etwas größeren Mengen wiederholt wurden. Eine Erklärung dafür war aber nicht zu finden, denn da dieselbe Wirkung in so ausgesprochenem Maße nur von diesen beiden chemisch ganz verschiedenen Substanzen hervorgerufen war, konnten Rückschlüsse auf irgend eine Gesetzmäßigkeit, wie etwa Einfluß der Reaktion oder bestimmter Jonen oder der Höhe des osmotischen Druckes nicht gezogen werden.

Die Spalthefenform, von Holtz eingehend als „Übergangsform" zu den Konidien beschrieben und bereits von Brefeld in seinen Zeichnungen dargestellt, ist auch regelmäßig im Bodensatz von Würzefläschchen vorhanden. Sie kommt derart zustande, daß in großen, durch den primären Zerfall des Mycels freigewordenen länglichen Zellen eine Streckung erfolgt und eine Querwand angelegt wird. Es folgt dann weiteres Längenwachstum der Zellen und je nach den Verhältnissen

das Auftreten von noch einigen Querwänden oder das baldige Abrunden der Zellen gegeneinander und die Spaltung. Unter günstigen Verhältnissen würde durch das kräftige Spitzenwachstum ein zusammenhängendes Mycel zustande kommen. Dies läßt sich aber durch hohe Temperatur und reichlichen Luftzutritt, also in Tröpfchenkulturen bei etwa 30° C., derart reduzieren, bzw. der Zerfall läßt sich derart beschleunigen, daß selten mehr als höchstens dreizellige Gebilde entstehen; eine solche Kultur gewährt den Anblick einer typischen Spalthefe (Abb. 5 und 6). Die Entwicklung bleibt dann übrigens häufig auf diesem Stadium stehen, es kommt also nicht mehr zur Ausbildung von Dauer-oidien, und die Zellen sterben schon nach mehreren Tagen ab, viel schneller als die Oidien.

Von größerem Interesse wurde diese Form, ihre Entstehung und die verschiedenen Modifikationen dadurch, daß in letzteren geradezu ein Schulbeispiel gefunden wurde, für die von Lindner aufgestellte Behauptung, daß zwischen dem bei Spalthefen und Sproßhefen vorliegenden Modus der Fortpflanzung keineswegs ein prinzipieller, sondern nur ein gradueller Unterschied vorliege. Gerade diese Übergangsformen wurden bei dem Endomyces Magnusii in allen nur denkbaren Stadien aufgefunden.

Der bei der typischen Spaltung stattfindende Vorgang ist von Lindner[1]) für Schizosacch. Pombe wie folgt beschrieben:

„An der Trennungsstelle (der beiden Tochterzellen) ist die noch sehr zarte Haut für einen von innen kommenden Druck sehr nachgiebig; sie wölbt sich stark nach außen vor und wächst zu einem Schlauche aus, bis die Größe der ursprünglichen Zelle ungefähr erreicht ist, oft aber auch noch länger. Das hinzukommende neue Stück der Zelle ist anfangs etwas dünner als das alte; der Unterschied gleicht sich jedoch aus und es bleibt an der Grenze beider nur noch ein feiner, ringförmiger Absatz erkennbar."

Solche Formen des Endomyces Magnusii sind in Abb. 5 und 6 und vereinzelt auf Abb. 1 und 2 abgebildet. Der Übergang vollzieht sich nun in zweifacher Weise: erstens im Hinblick auf Durchmesser und Größe der Ausstülpung. Diese braucht keineswegs immer den Durchmesser der Mutterzelle zu erreichen und auch nicht zu einem langen Schlauche auszuwachsen. In Abb. 18 sind die verschiedensten Übergangsformen zusammengestellt. Das Präparat stammte aus dem Bodensatz des Assimilationsversuches mit Maltose; derartige Zellen fanden sich darin reichlich neben dem kräftig entwickelten Mycel; sie kommen aber auch in

1) Mikroskopische Betriebskontrolle, 1. Auflage, S. 221.

allen möglichen anderen Kulturen vor. Ebenso sind die „Bajonettformen" Ludwigs Beispiele für eine Ausstülpung von geringerem Durchmesser als dem der Mutterzelle. Solche Zellen konnten von Lindner bei direkter Untersuchung von Schleimflüssen, die Ludwig aus Greiz übersandt hatte, aufgefunden und photographiert werden (Abb. 16).

Das zweite Moment ist in dem Zeitpunkt zu erblicken, an dem die trennende Querwand angelegt wird. Dies erfolgt in dem einen extremen Fall erst, wenn die Tochterzelle die Größe der Mutterzelle erreicht hat, in dem anderen so schnell wie möglich, sobald nur die Größe der Ausstülpung eine Abrundung und Trennung zuläßt. Ist die Ausstülpung dabei von dem Durchmesser der Mutterzelle, so entstehen Formen wie Abb. 5; ist sie weniger dick, so kommen die Übergangsformen (Abb. 18) zustande; ist sie von sehr geringem Durchmesser, so ist naturgemäß die Anlage der Querwand auch bedeutend früher möglich, als bei größerem Durchmesser; die Zellen runden sich nach der Trennung sofort gegeneinander ab und haben dann, ihrer mehr rundlichen Gestalt entsprechend, nur einen sehr kleinen Teil der Membran gemeinsam; der extremste Fall in diesem Sinne ist dann eine typische Sprossung. Eine Zelle, die diesem Modus schon sehr nahe kommt, zeigt Abb. 1.

Eine bemerkenswerte Übereinstimmung ist es, daß die Spalthefeformen bei Endomyces Magnusii sich vornehmlich entwickeln bei Temperaturen, unter denen auch die bekannten Schizosaccharomyceten vegetieren: S. Pombe gedeiht bekanntlich im Hirsebier der Neger, S. octosporus auf Trauben in Griechenland, Kleinasien und der Türkei, S. mellacei in der Melasse von Zuckerrohr auf Jamaika, also alle in wärmeren Klimaten. Vielleicht ist also in der Spaltung eine Anpassung dieser Pilze an die höhere Temperatur zu sehen.

Die Oidien bilden in Tröpfchenkulturen bei Temperaturen unter 25° in der Regel das letzte Stadium der Entwicklung. Sie finden sich in großer Menge in älteren Kulturen auf festem Nährsubstrat aller Art und regelmäßig auch in Würzefläschchen. In letzteren fast rein als ganz dünnes unbenetzbares silberweißes Häutchen auf älteren Kulturen, wenn die dicken gelben Mycelflocken der Kahmhaut zu Boden gesunken sind. Sie haben anfangs fast homogenen Inhalt, später lassen sich körnige Gebilde und zuletzt mehrere oder wenige, größere oder kleinere Tröpfchen erkennen, die Hansen bereits durch Auflösen mit Alkohol und Äther als Fetttröpfchen bestimmt hat. Sie geben leicht die Braun- bis Schwarzfärbung mit Osmiumsäure und färben sich mit Sudan deutlich rot. Holtz schreibt ihnen die Bedeutung von Reservesubstanzen zu, eine Bestätigung dafür ist in der Beobachtung zu erblicken, daß bei der Keimung der Oidien die Tröpfchen langsam kleiner und fast ganz aufgezehrt werden.

Ferner konnte Holtz nachweisen, daß die Oidien mit derartig verdickter Membran und Fetttröpfchen ihre Keimkraft länger bewahren, als andere Zellformen. Sie sind also als eine Dauerform des Pilzes aufzufassen.

2. Chlamydosporen.

Ludwig hat schon in seiner ersten Veröffentlichung darauf hingewiesen, daß außer der beschriebenen Oidienbildung die Bildung von Oidien innerhalb von Mycelfäden stattfinden kann und erhielt diese ausnahmslos bei Zusatz von Rohrzucker zur Fleischpeptongelatine. Brefeld erreichte die endogene Oidienbildung im Hungerzustande und erklärt sie, indem er sich der Auffassung Ludwigs anschließt, wie folgt:

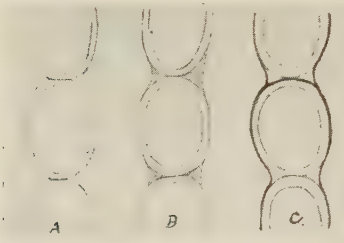
„Hier nimmt die Membran der Fäden an der Oidienbildung keinen Anteil. Die durch Teilung des Inhalts entstehenden Oidien bekommen eine neue Membran und fahren dann nach deren Anlage fort sich zu spalten bis in die letzten Glieder. Das Endresultat ist ein Schlauch mit den im Innern reihenweise angeordneten Oidien. ....."

Holtz hat ähnliches erreicht, indem er kräftig wachsendes Mycel in steriles Wasser brachte und konnte an solchen Präparaten das Fortschreiten der Oidienbildung beobachten und zeichnen. Er kam aber zu dem Schluß, daß es sich dabei um Durchwachsungserscheinungen handelt, wie sie Lindner (3) bei Epicoccum purpurascens beschrieben und in einem sehr schönen Fall auch bei Oidium lactis gefunden hat (M. B. S. 363), aber keineswegs um Chlamydosporenbildung im Sinne Brefelds. Nach den vorliegenden Zeichnungen hat in allen diesen Fällen die gleiche Erscheinung vorgelegen und es ist mir auch gelungen, ein den Holtzschen Beschreibungen entsprechendes Gebilde zu photographieren (Abb. 13).

Es trat aber außerdem ziemlich regelmäßig Bildung von echten Chlamydosporen auf, wenngleich einige Stämme eine ungleich größere Neigung dazu zeigten wie andere. Sie wurde häufig beobachtet am Material, das nach der Holtzschen Methode behandelt war, war aber auch nicht selten auf anderen Nährböden: ziemlich reichlich auf Gelatine von Eichenrindendekokt; ganz besonders üppig in Pflaumendekokt, und in einzelnen Fällen fast in jedem älteren Würzefläschchen. Aus Anordnung und Größe der Zellen geht zweifellos hervor, daß für ihre Entstehung die Holtzsche Erklärung als Durchwachsungserscheinung gar nicht in Frage kommen kann, sondern daß sie aus den vegetativen Hyphenzellen sofort oder nach vorangegangener Teilung dieser Zelle in der Weise entstanden sind, daß nach mehr oder minder starker

Schrumpfung des Inhaltes sich das Plasma mit einer neuen Membran umgeben hat. Während die vegetativen Mycelzellen bald absterben, stellen diese Gebilde einen Dauerzustand dar, wie die exogen gebildeten Oidien, mit denen sie sich auch sonst gleich verhalten: sie verdicken ihre Membran und bilden im Innern Fetttröpfchen.

Holtz scheint die Erscheinung auch bekommen zu haben, eine seiner Zeichnungen bringt ganz ähnliche Formen wie Abb. 9. Er beschreibt diese „Abänderungen der Vorgänge der Konidienbildung an altem Mycel" wie folgt: . . . Infolge dieses abnormen Zustandes des alten Mycels kann sich auch die Konidienbildung in der Regel nicht in der normalen oben erwähnten Weise vollziehen, es kommt, abgesehen von akrogenen, vielfach zu interkalaren Teilungen, deren Produkte mit den abgestorbenen Hyphenzellen gewöhnlich verbunden bleiben, wie überhaupt die Leichtigkeit der Loslösung der Konidien mit dem Alter des Mycels bedeutend zu schwinden scheint. Wir erhalten dann Bilder, die ganz den Anschein erwecken, als handle es sich hier um Hyphen, die sich zu besonderen Konidienträgern ausgebildet haben, so z. B. in alten Würzekulturen, wo einzelne noch lebenskräftige Hyphenzellen sich durch wiederholte Querwandbildung und oft enorme Wandverdickung zu Konidienreihen ausgestalten; diese nehmen teils die Spitze der Hyphen ein, teils liegen sie in der Kontinuität derselben. Besäßen diese Bildungen einen besonderen morphologischen Wert, so müßten sie wohl weit häufiger und regelmäßiger auftreten als es in der Tat ist."



Diese letzte Argumentation scheint mir in keiner Weise zwingend, nicht einmal sehr einleuchtend. Einerseits habe ich die Erscheinung, wie gesagt, recht häufig beobachten können, andererseits ist doch nicht einzusehen, weshalb ihre Seltenheit ihren morphologischen Wert beeinträchtigen soll. Sodann konnte ganz regelmäßig beobachtet werden, daß an der ursprünglichen Membran des Fadens eine Spaltung wie beim Zerfall in Oidien nicht eingetreten war; es kam hier darauf an, die Verhältnisse an der Berührungsstelle zweier Oidien möglichst genau festzustellen. In der nebenstehenden schematischen Zeichnung stellt Figur A die Aneinanderreihung der Oidien dar, wie sie nach der Holtzschen Annahme der Entstehung durch ausgebliebene Loslösung exogen gebildeter Oidien, entsprechen würde, Figur B den regelmäßig festgestellten Sachverhalt: Die ursprüngliche Fadenmembran umschließt die darin liegenden Oidien,

wie wenn man Glaskugeln in einen zu engen aber elastischen Gummischlauch stecken wollte, hat also an der Bildung von deren Membran keinen Anteil genommen. Es ist dabei von einer die normale Oidienbildung einleitenden Spaltung der Querwand von außen nach innen keine Spur zu bemerken. Die ursprüngliche Querwand ist zwischen den Oidien überhaupt fast nie zu sehen. Es ist wohl so zu denken, daß sie sich wie in Figur C bei starkem Anschwellen einer Oidie dieser vermöge ihrer Elastizität glatt angelegt hat und dann, ihrer geringen Dicke entsprechend, sich von der dicken Oidienwand nicht mehr abhebt, genau so wie es mit der, der Rundung der Oidie anliegenden Fadenmembran der Fall ist.

Den deutlichsten Beweis dafür, daß die ununterbrochene Hyphenmembran die Oidien noch umgibt, brachte das in Abb. 12 abgebildete Präparat. Es stammt aus einer Kultur auf Plaumendekokt und zeigt die Chlamydosporenbildung in denkbar üppigstem Maße. Es waren hier an langen Fäden sämtliche Zellen zu Chlamydosporen umgewandelt worden und diese so enorm angeschwollen, daß an einzelnen Stellen ein Platzen der umgebenden Membran stattgefunden hatte und die Oidien ausgetreten waren. An der x bezeichneten Stelle der Abb. 12 sieht man zwei endogen gebildete, durch Längsaufreißen der Membran freigewordene Oidien neben der entleerten Membran des Fadens liegen, ohne daß dessen Zusammenhang dadurch unterbrochen wäre.

Es wären demnach die so gebildeten Oidien als echte Chlamydosporen zu bezeichnen, die physiologisch den Wert einer Dauerform besitzen. Daß dieser Erscheinung aber ebenso wie den von Holtz beschriebenen Durchwachsungen keinerlei systematischer Wert beizulegen ist, dürfte wohl ohne weiteres klar sein.

3. Askenfruktifikation.

Die Fruktifikationsorgane, Enden von Haupt- oder Seitenästen ansitzende Asken mit vier warzigen Sporen, sind zuerst von Ludwig in frischem Material in der Leuconostoc-Gallerte gefunden und gezeichnet worden. Brefeld gelang es auch, sie in künstlichen Kulturen zu ziehen, indem er durch stetige Zugabe neuer Gelatine das Durchwachsen der Mycelien zur Oberfläche und den damit verbundenen Zerfall in Oidien verhinderte. Hansen und Holtz haben diese Versuche ohne Erfolg wiederholt und, wie eingangs erwähnt, deshalb geglaubt, ihren Pilz nicht mit dem Endomyces Magnusii identifizieren zu sollen. Erst kürzlich ist es Guillermond (1) gelungen auf Karottenscheiben die Asken zu Gesicht zu bekommen. Er konnte dabei neben ungeschlechtlicher auch geschlechtliche Askenbildung beobachten, und beschreibt letztere als

heterogamische Konjugation. Eine ausführlichere Abhandlung über diesen Gegenstand soll demnächst erscheinen. Nach einer brieflichen Mitteilung ist es Guillermond aber nicht gelungen, irgend welche Aufschlüsse zu bekommen über die Bedingungen, unter denen sich die Asken bilden. Es ist auch mir, obwohl der größte Teil der Zeit und Mühe darauf verwendet wurde, nicht gelungen, weder bei meinen Kulturen, noch bei der von Guillermond übersandten, die Asken zu bekommen. Es steht für mich ganz außer Frage, daß in allen Kulturen im Laboratorium der Endomyces nicht in der Üppigkeit gedeiht, wie dies in der Natur stattfindet. Ein Vergleich der mit gleichen Vergrößerungen aufgenommenen Photographien legt diese Vermutung nahe. In den allerersten Kulturen, also kurz nachdem er von seinem natürlichen Nährboden weggenommen war (Abb. 3), zeigte er wesentlich dickeres und üppigeres Mycel wie das in Würze regelmäßig heranwachsende (Abb. 1 u. 2). Auch die von Lindner aus frischem Greizer Material aufgenommenen Bilder (Abb. 15 u. 16) zeigen den Endomyces Magnusii in viel üppigerem Aussehen und in ganz vereinzelten Fällen trat ein ähnlich üppiges Wachstum auf einigen der zahlreichen Kulturen auf Karotten wieder auf.

Jedenfalls ist die Möglichkeit einer besseren Entwicklung, wie auf den in der Regel benutzten Nährböden, erwiesen und damit die Erklärung des Ausbleibens der Fruktifikation durch zu kümmerliches Wachstum nahegelegt. Dazu kommt, daß Ludwig die Asken nur in der dicken Leuconostoc-Gallerte fand, also vielleicht der ganz spezifische Reiz dieses Pilzes, sei es durch chemische oder physikalische Wirkung, zu ihrer Ausbildung nötig ist.

Da alle diese Versuche keine positiven Ergebnisse gehabt haben, erübrigt es, näher darauf einzugehen. Eine kurze Zusammenstellung ist aber doch vielleicht nicht ohne Interesse, schon weil sich daraus vielleicht für ähnliche Versuche nützliche Anregungen ergeben.

Als das Nächstliegende wurden natürlich die in der Literatur angegebenen Methoden nachgeprüft, und als sie nicht den gewünschten Erfolg gaben, in allen möglichen Variationen wiederholt. Es wurden Kulturen nach Brefeld unter Gelatine angelegt und dieser verschiedene Zuckerarten zugesetzt, und die Versuche bei verschiedenen Temperaturen angestellt; allerdings waren hier ja die Grenzen durch die Konsistenz der Gelatine ziemlich eng gesteckt. Wie oben erwähnt, trat in den meisten Fällen doch ziemlich bald der Zerfall des Mycels ein, auch wenn die Fäden nicht bis zur Oberfläche durchgewachsen waren. Ferner wurde zu solchen Kulturen die für die Zuckerassimilationsversuche hergestellte Gelatine verwandt, also alle dort genannten Zuckerarten,

Glukoside, Alkohole, Dextrin und Stärke und als N-Quelle Asparagin, Pepton und NH_4 phosphat. Ferner wurde in vielen Versuchen Tannin zugegeben, weil es möglich schien, daß dieser auch in der Eichenborke vorhandene Stoff einen besonderen Reiz ausüben könne.

Die Methode von Guillermond wurde in ähnlich großem Umfang nachgeprüft. Die Kulturen standen im Thermostaten bei 20, 25, 30, 35°. Ferner, da die Ausbildung von Tagesringen in den Rollkulturen (vgl. S. 18) einen Einfluß des Tageslichtes vermuten ließ, wurden einige der Kulturen bei Sonnenlicht am Fenster, andere unter gelben oder blauen Glasglocken, andere im Dunkeln gehalten; wieder andere standen im luftverdünnten Raume. Endlich wurde, um festzustellen, ob die Fähigkeit der Sporenbildung als Eigentümlichkeit einzelner Zellen (als Mutation) auftrete, die jedesmalige Impfung des in Wasser aufgeschlämmten Materials so bemessen, daß auf den Karottenstückchen die einzelnen Kolonien getrennt zur Entwicklung kamen, von denen dann aus jeder Kultur eine große Anzahl untersucht wurde. Unterschiede an den einzelnen Kolonien traten im Zusammenhang mit der verschiedenen Feuchtigkeit des Substrates auf. Bei Trockenheit trat der Zerfall in Oidien rascher ein und die Kolonien erschienen früher mehlig weiß; während sie bei größerer Feuchtigkeit größere, breiige Beläge bildeten. An einzelnen wurden, wie gesagt, daneben dann oft ganz abnorm dünne Hyphen und entsprechend kleine Konidien gefunden, besonders in größeren Mycelklumpen.

Nach diesen Erfahrungen wurde nun angestrebt, durch geeigneteres Nährmaterial dieses bessere Wachstum häufiger herbeizuführen. Es wurden die verschiedensten natürlichen Nährböden gegeben: Brot befeuchtet mit Wasser, Würze, Pflaumendekokt, Milch, Honigwasser, diese letzteren auch als Flüssigkeiten zu Kulturen in kleinen Fläschchen verwandt. Ferner wurde eine Gelatine aus Eichenrindendekokt hergestellt, auf der sich aber nur höchst spärliches Wachstum einstellte.

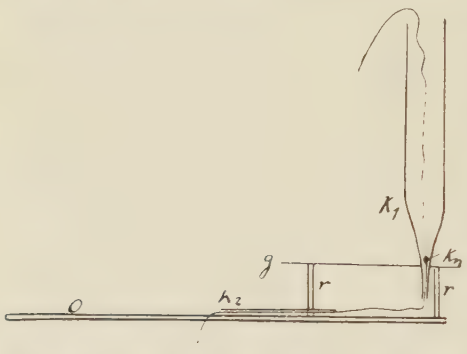
Auch die von Lindner bei Endomyces fibuliger angewandte Methode, die bei der Nachprüfung bei diesem Pilz wiederum zu einem guten Resultat führte, wurde verschiedentlich versucht. Es handelt sich darum, daß kräftig wachsendes Mycel in Wasser ausgewaschen und dann am besten gleich im Zentrifugierröhrchen stehen gelassen wird, so daß der Pilz gezwungen ist, die eigenen Selbstverdauungsprodukte zu assimilieren. Auch hier wurden dieselben abnorm dünnen Hyphen beobachtet.

Um gerade den Einfluß der Selbstverdauungsprodukte festzustellen, wurden eine Anzahl alter Würzekulturen, die über ein Jahr gestanden hatten, wo also zweifellos schon lange Selbstverdauung eingetreten war, aufgekocht und abfiltriert und das Filtrat, wie es war und mit Dextrose-

zusatz und als Gelatine zur Kultur verwandt. Es trat gutes Wachstum und bei Dextrosezusatz lebhafte Gärung ein: irgend welche neue Formen wurden aber nicht beobachtet.

Auch die Kulturmethode auf Gipsblöcken nach Hansen wurde angewandt und als Aussaatmaterial neben dem Bodensatz von Würzefläschchen auch größere Mycelmengen verwandt, die in Würze unter Zusatz von Soda bzw. Zitronensäure gezogen waren.

Zum Schluß wurden in einer Reihe von Kulturen noch einige bei dem natürlichen Vorkommen möglicherweise bedeutsamen Momente nachgeahmt: es waren einerseits die Kulturen zusammen mit anderen Organismen, dann die Kulturen in fließender Würze. Es wurden besonders solche Organismen gewählt, die durch ihre spezifische Lebenstätigkeit besondere Reize hervorzurufen imstande zu sein schienen, so eine Mycodermaspecies, um geringere Sauerstoffspannung zu erzielen, Kulturhefe, um die Produkte der Gärung wirken zu lassen, Dematium pullulans und ein Schleimbakterium aus Eichenschleimfluß, von Herrn Dr. Henneberg als B. xylinum bezeichnet, um eine Gallerte zu erzeugen, wie sie dem natürlichen Vorkommen entspricht. Der Leuconostoc Lagerheimii konnte nicht aufgefunden, wenigstens nicht isoliert werden, sonst wäre die Kultur in seiner Gallerte als einer der wichtigsten Versuche wohl zunächst angesetzt worden.



Die Kulturen in fließender Würze schienen deshalb von Interesse, weil durch die bedeutend reichlichere Nahrungszufuhr und sofortige Abführung der Stoffwechselprodukte vielleicht ein besseres Wachstum hätte hervorgerufen werden können. Sie wurden nach einigen Versuchen in der Weise hergestellt, daß der Ring (r) einer Böttcherschen feuchten Kammer an dem einen Ende eines Objektträgers (o) angebracht und mit einem Glimmerblättchen (g) bedeckt wurde. Durch eine darin eingeschnittene Kerbe wurde die Kapillare K_1 in die Kammer eingelassen, um die Zufuhr frischer Würze zu ermöglichen: an der diametral gegenüber liegenden Seite wurde die Ableitung durch eine unter dem Ring eingelegte Kapillare K_2 ermöglicht. Um ein gleichmäßiges Fließen zu ermöglichen, war vor dem Einkitten durch beide Kapillaren ein Zwirnsfaden gezogen, der außerdem

durch Heben und Senken des Knotens (kn) in der Kapillare K_1 eine Regulierung des Stromes ermöglichte. Der Apparat wurde zum Schluß mit Asphaltlack verkittet, die Würze von einem hochstehenden Gefäß durch einen Gummischlauch der Kapillare K_1 zugeführt. Ein Nachteil ist die Schwierigkeit der Sterilisation; man kann aber sehr wohl größere Mengen des Pilzes in die Kammer geben und so durch sofortiges kräftiges Impfen ein Überhandnehmen der Infektion verhindern; bis zu zehn Tagen konnten die Kulturen sehr wohl stehen bleiben. Es war dann auch ein recht kräftiges Wachstum eingetreten, aber nach Sporen suchte man doch vergebens.

Bei der großen Anzahl der Versuche ist natürlich die noch größere Zahl der Möglichkeiten noch lange nicht erschöpft, und es ist wohl gerade die für die Fruktifikation nötige Kombination von Umständen noch nicht erhalten. Außerdem ist aber zur Bewertung der Versuche zu bedenken, daß sie ja mit Material angestellt wurden, das zum Teil schon beträchtliche Zeit unter den wenig zusagenden Verhältnissen im Laboratorium gehalten war, und es sollte mich keineswegs wundernehmen, wenn mit frischerem Material, sofort nach dem Einsammeln und Isolieren, die eine oder andere Methode zum Erfolg führen würde.

4. Makroskopisches Aussehen.

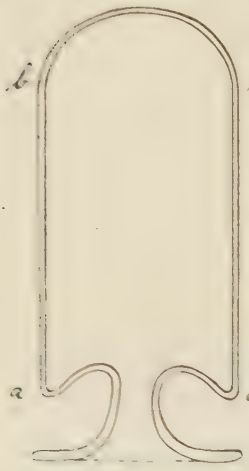
Der Endomyces Magnusii bildet auf Würzegelatine und anderen festen Nährböden einen ziemlich gleichförmigen, gelblich hellgrauen Belag von Aussehen und Konsistenz etwa wie Brotteig, der Rand ist oft hellweiß; ebenso erscheint die ganze Oberfläche, besonders wenn die Kulturen nicht zu feucht gehalten waren, im späteren Stadium „wie mit einem weißen Schimmel besprengt".

Die Riesenkolonien auf Gelatine sind fast strukturlos mit gleichmäßig, allmählich in fast mikroskopisch feine Strahlen auslaufendem Rand. Manchmal erscheinen einzelne Äste durch stärkeres Wachstum hervorgehoben, so daß sich radiale Strahlen bilden. Die größte Masse der Kolonie liegt unter der Oberfläche der Gelatine, die bis etwa 1 cm tief von dichtem Mycel durchsetzt erscheint. Die Abb. 22 zeigt eine 14 Tage alte Kolonie. Verflüssigung der Gelatine war, aber keineswegs regelmäßig, frühestens nach etwa acht Wochen festzustellen.

Die schon von Ludwig und Hansen beobachtete Ausbildung von oft wunderbar fein verzweigten Strahlen in der Gelatine zeigt sich am schönsten in der Stichkultur. Eine schwache Vorstellung davon gibt die Photographie (Abb. 23) einer achttägigen Stichkultur in Würzegelatine. Ein Optimum des Wachstums zeigt sich etwa ½ cm unter der Oberfläche, also bei etwas verminderter Sauerstoffspannung. In

den tiefsten Teilen der Kultur ist infolge zu geringen Luftzutrittes nur spärliches Wachstum eingetreten.

Als weiteres Charakteristikum sei das Wachstum in „Rollkulturen" angeführt. Nach Lindner werden sie in der Weise hergestellt, daß in zylindrischen Gläsern von nebenstehendem Querschnitt (D. R. P. 211 037) die den Linien a b bzw. a_1 b_1 entsprechenden Flächen mit einer ganz dünnen Gelatineschicht überzogen werden. Ist dies unter den durch die Rücksicht auf Sterilität vorgeschriebenen Vorsichtsmaßregeln geschehen, so lassen sich durch beliebige Impfung Kolonien kultivieren, die sowohl für die Unterscheidung der Arten von Bedeutung, als auch besonders bei Farbstoff bildenden Pilzen von unübertrefflicher Schönheit und Farbenpracht sind.



Die von Endomyces Magnusii in solchen Gläsern erhaltenen Kulturen zeichnen sich durch die prachtvollen, reich verästelten Strahlen aus. Merkwürdig ist aber dabei, daß neben solchen auch andere Strahlen zur Ausbildung gelangen, die einen fast gleichmäßigen Belag liefern. Es lag die Vermutung nahe, daß hier vielleicht eine Abspaltung verschiedener Rassen eingetreten sei; die verschiedentlich wiederholten Versuche in dieser Richtung gaben aber kein positives Resultat. Auch bei direkter Untersuchung verschieden aussehender Stellen konnten immer nur ganz gleichmäßige Oidien gefunden werden.

An den Strahlen, die einen gleichmäßigen Belag gebildet hatten, ließ sich noch ein Phänomen konstatieren, das zuerst in ausgedehntem Maße von Dr. Olga Kniſchewsky[1]) im Laboratorium des Instituts für Gärungsgewerbe untersucht worden ist. Es ist die Bildung von konzentrischen Ringen, deren Anzahl mit der Anzahl der seit Anlage der Kultur verflossenen Tage übereinstimmt und deren Ausbildung, wie Dr. Kniſchewsky nachweisen konnte, durch die Wirkung des Tageslichtes verursacht wird (vgl. Abb. 19, 20 u. 21).

IV. Physiologie.

1. Ernährungs- und Gärungsphysiologie.

Besondere Aufmerksamkeit wurde auf die Untersuchung des Gärvermögens und der Ernährungsbedingungen des Pilzes verwandt und

1) Landw. Jahrbücher XXXVIII, Ergänzungsband V, S. 341, 1909.

dabei eine Reihe sehr interessanter Resultate erhalten. Es seien zunächst die angestellten Versuche über das Verhalten gegen verschiedene Zuckerarten, die Alkoholproduktion und die Assimilation von Zucker und Eiweiß mit ihren Ergebnissen nur kurz angegeben; eine zusammenfassende und vergleichende Darstellung der Resultate soll, da sie im Zusammenhang für unsere Auffassung von den chemischen Vorgängen bei der Assimilation und Vergärung von Kohlehydraten von Wichtigkeit sind, einem besonderen Abschnitt vorbehalten bleiben.

a) Verhalten gegen verschiedene Zuckerarten.

Methode. Bei den morphologisch häufig schwer unterscheidbaren Gärungsorganismen ist es von größtem Interesse, neben ihrem Aussehen andere Merkmale zu finden, die ein leichteres Erkennen der Arten ermöglichen. Ein zu diesem Zweck sehr geeignetes Charakteristikum gab ihr Gehalt an Enzymen, der in dem Verhalten gegen Zuckerarten zum Ausdruck kommt und auf diese Weise leicht festgestellt werden kann.

Zu diagnostischen Zwecken wurde das verschiedene Gärvermögen in ausgedehntem Maße zuerst von Lindner (2) untersucht, der von sämtlichen Hefen der Berliner Sammlung ihr Verhalten gegenüber 21 Zuckerarten feststellte. Kohl (H. S. 250) ging dann soweit, daß er in seiner Systematik der Hefen bei der Gattung Saccharomyces eine allerdings rein praktische Einteilung nach ihrem Verhalten gegen Dextrose, Saccharose, Maltose und Laktose in sechs Untergruppen vornahm. Ferner sei noch darauf hingewiesen, daß auf eben diese Anregungen hin Prior die Anwendung der Hefen als Reagenzien in der Nahrungsmittelchemie empfahl.[1])

Zur Feststellung der einzelnen Tatsachen hat sich die von Lindner (1) sehr eingehend beschriebene Kleingärmethode vorzüglich bewährt. Es sei hier darüber zur Orientierung nur soviel erwähnt, daß sie darin besteht, daß einige Körnchen des zu untersuchenden Zuckers in einem genügend großen Tropfen sterilen Wassers gelöst und im hohl geschliffenen Objektträger durch beigemischte Hefe — bei Abschluß der Luft durch ein Deckgläschen und einen Vaselinering — zur Vergärung gebracht werden. Eine Gärung gibt sich dann spätestens nach 24 Stunden durch mehr oder minder starke Gasentwicklung zu erkennen. Um die verschieden starke Intensität der Gärung zum Ausdruck zu bringen, wurden von Lindner die Zahlen 1, 2, 3 in den Tabellen angegeben, wobei 3 bedeutet, daß durch sehr kräftige CO_2-Entwicklung der ganze Hohlraum des Präparates von dem Gas erfüllt war: 2, daß nur etwa die halbe

1) Zeitschr. Untersuchung d. Nahrungs- u. Genußmittel 1903; ebenda von J. König und P. Hörmann über dasselbe 1907, 13, S. 113.

Höhlung von Kohlensäure ausgefüllt wurde und 1, daß nur einzelne Gasblasen auftraten. Allerdings haben diese Abstufungszahlen nur relativen Wert, da sie durch das Mengenverhältnis von Hefe, Zucker und Flüssigkeit beeinflußt werden. In allen zweifelhaften Fällen wird die Kohlensäure durch Zugabe von Natronlauge beim Zurseiteschieben des Deckgläschens als solche nachgewiesen.

Eine Prüfung auf die Genauigkeit dieser Methode hat kürzlich Will veröffentlicht.[1]) Er konnte bei Torulahefen, die bei der Kleingärmethode keine Gärung gezeigt hatten, in größeren Gärversuchen, wobei die betreffenden Zucker in Hefewasser gelöst waren, eine allerdings minimale Alkoholproduktion von 0,1 bis höchstens 0,15 pCt. refraktometrisch feststellen. Er kommt deshalb zu dem Schluß, daß die Lindnersche Methode nur zur Orientierung geeignet ist und in jedem einzelnen Fall ein größerer Gärversuch zur genauen Feststellung folgen muß. Darauf wäre zu erwidern, daß doch wohl keine andere Methode so eindeutige Resultate zu liefern imstande ist, weil die große Anzahl von Fehlerquellen, die sich bei Gärversuchen im großen einstellen, durch die Einfachheit der Versuchsanstellung von vornherein ausgeschaltet wird. So ist es z. B. eine bekannte Tatsache, daß die Alkoholproduktion eines Pilzes in hohem Maße von der dargebotenen Stickstoffquelle abhängig ist. Versuche darüber liegen vor über Bacterium coli;[2]) ferner liegen Arbeiten über diese Fragen vor von H. Pringsheim: „Über den gärungsfeindlichen Einfluß stickstoffhaltiger Substanzen"[3]) und eine Arbeit über den Einfluß der chemischen Konstitution der Stickstoffnahrung auf die Gärfähigkeit und Wachstumsenergie verschiedener Pilze,[4]) wobei der Verfasser findet, daß eine Reihe von Pilzen, darunter auch die Hefe, nur in Gegenwart der — NH · CH — CO — Gruppe gärungsfähiges Plasma zu bilden imstande sind. Außerdem wurden gleichzeitig von E. W. Naumann Versuche darüber mit Epicoccum purpurascens angestellt. Ferner ist von F. Ehrlich Berlin nachgewiesen, daß die Eiweißkörper in ihren letzten Abbauprodukten, den Aminosäuren, eine Zersetzung erfahren, bei der ebenfalls geringe Alkoholmengen gebildet werden können. Eine weitere Möglichkeit ist, daß bei dem Wachstum des Pilzes durch eben diese Zersetzung Säuren gebildet werden, die unter Umständen die Spaltung des Zuckermoleküls bewirken können. Man würde auf Grund der dann eintretenden Vergärung der Spaltungsprodukte dazu verleitet werden, dem Pilz das

1) Zentralbl. f. Bakteriologie XXI, 1908, S. 389.
2) Kuhl, Archiv für Hygiene 1906, Nr. 58, S. 125.
3) Wochenschr. f. Brauerei 24, 1907, S. 67.
4) Biochemische Zeitschr. Bd. VIII, S. 119.

dem Zucker entsprechende Enzym zuzusprechen: sein Fehlen würde sich vielleicht bei anderer Stickstoffnahrung, ganz zweifellos aber bei der Kleingärmethode, zu erkennen geben. Als das nächstliegende Beispiel wären endlich noch meine Versuche mit Endomyces Magnusii anzuführen, der zwar Dextrose in Hefewasser glatt vergärt, in physiologischer Nährlösung mit Asparagin als Stickstoffquelle aber nur ganz geringe Alkoholmengen produziert, ohne daß sichtbare Gärungserscheinungen auftreten. Es ist deshalb nur mit Freude zu begrüßen, wenn uns mit der Kleingärmethode ein Mittel an die Hand gegeben ist, unter Ausschaltung all dieser komplizierten Verhältnisse nur auf die in dem betreffenden Organismus vorhandenen Enzyme zu prüfen, indem in denkbar einfachster Weise eine bestimmte Menge des Pilzes, der nun nicht erst zu wachsen braucht, direkt mit der wässerigen Lösung des Zuckers in Reaktion gebracht wird. Ganz abgesehen davon ist durch die Einfachheit und Schnelligkeit der Versuchsanstellung die Möglichkeit geboten, ohne großen Aufwand an Zeit und Material das Verhalten gegen eine große Anzahl von Zuckerarten festzustellen, was im großen Maßstabe häufig schon durch die Kostbarkeit der Zuckerpräparate sich von selbst verbieten würde. Daß dann einer solchen Versuchsreihe ein viel größerer diagnostischer Wert beizulegen ist, als wenn nur, wie bei Mohl, vier Zuckerarten zur Prüfung gelangen, braucht wohl nicht erst erwähnt zu werden.

Ich habe deshalb bei meinen Arbeiten die Kleingärmethode unverändert angewandt, und meine Resultate in einer Tabelle nach Lindnerschem Muster zusammengestellt. Diese ist als weiterer Beitrag gedacht, um im Sinne Lindners die Identifikation von Gärungsorganismen nach physiologischen Merkmalen zu ermöglichen. Die einzelnen Resultate seien jedesmal bei der Besprechung der betreffenden Organismen angeführt. Hier sei nur noch zur Zusammenstellung erwähnt: Es lag mir daran in die Tabelle aufzunehmen:

1. alle mir bekannten Vertreter der Gattung Endomyces,
2. alle mir bekannten Hefen aus Schleimflußgärungen,
3. zum Vergleich mit diesen einige ähnliche Hefen, soweit sie im Text besprochen sind, und endlich
4. die von Klöcker neuerdings beschriebenen Hefen Debaryomyces und Schwanniomyces, weil sie mir gerade zur Verfügung standen und ein weiterer Beitrag zu ihrer Kenntnis sicher von Interesse ist.

Die Zuckerarten waren teils von Kahlbaum, die seltenen waren noch dieselben Präparate, die Lindner verwandt hatte, also von

Geheimrat Prof. Dr. E. Fischer, Berlin, stammend, Trehalose von Herrn Kalanthar, Melibiose von Herrn A. Bau.

Versuche mit Endomyces Magnusii. Über das Verhalten des Endomyces Magnusii gegen Zuckerarten liegt nur die Angabe von Hansen (1) vor, daß in Dextroselösung Gärung stattfindet, Saccharoselösungen invertiert werden, in Lösungen von Laktose und von Dextrin in Hefewasser keine Gärung, in Stärkelösung keine Zuckerbildung nachzuweisen ist. Ich konnte feststellen, auf Grund wiederholter übereinstimmender Versuche mit den sechs von mir isolierten, sowie den von Dr. Claußen und Prof. Guillermond erhaltenen Kulturen, daß kräftig vergoren werden: Dextrose, Mannose, Fruktose, Rohrzucker; mäßig stark wird Raffinose vergoren, wobei wahrscheinlich die durch die Wirkung der Raffinase entstandene Melibiose intakt bleibt und nur die abgespaltene Fruktose vergoren wird:[1]) spurenweise, aber doch regelmäßig wird Galaktose angegriffen. Das Material wurde möglichst frischen, also fünf bis höchstens zehntägigen Kulturen auf Würzegelatine entnommen, die Resultate aufgenommen, nachdem die Präparate etwa 20 Stunden in Thermostaten bei 27 bis 29° C gestanden hatten.

b. Alkoholproduktion.

Im Anschluß an diese Versuche erschienen zur Vervollständigung des Bildes noch Gärversuche in größerem Maßstabe mit quantitativer Bestimmung der Alkoholproduktion notwendig. Die darüber in der Literatur vorliegenden Angaben sind nicht ganz übereinstimmend.

Ludwig berichtet schon in seinen ersten Arbeiten über das Auftreten einer lebhaften Gärung in den Saftflüssen und glaubte dafür

1) Diese vielfach als Invertinspaltung bezeichnete Hydrolyse der Raffinose wurde früher der Invertase zugeschrieben. Vgl. O. Sullivan, (Journal Chem. Soc. Trans. Bd. LVII 1890, S. 834) und Bau (chem. Ztg. Bd. XIX, S. 1873; 1895). Dagegen fanden Pauß und Vogel (Zeitschr. f. Biologie Bd. XXXII S. 304, 1895) und Fischer und Niebel (Chem. Zentralblatt, Bd. I, S. 499, 1896), daß der Invertase enthaltende Dünndarm des Pferdes und Hundes Raffinose nicht zu spalten vermag. Lindner (2) schreibt darüber: Die Raffinose wird in einigen Fällen vergoren, wo der Rohrzucker intakt bleibt (Hefe 370; S. octosporus), andererseits wird sie intakt gelassen von Arten, welche Rohrzucker und d-Fruktose vergären (Monilia condida, Hefe 602). Auffällig ist ferner, daß die Hefe Logos die Raffinose schwach, die Melibiose und den Rohrzucker aber stark vergärt. Die Annahme eines besonderen Enzymes, Raffinose, wird daher nicht von der Hand zu weisen sein. Vgl. Bau: „Ist für die Spaltung der Melitriose in Melibiose und d-Fruktose durch Organismen ein besonderes Enzym anzunehmen?" W. f. B. 1900, S. 698.

den Endomyces Magnusii verantwortlich machen zu sollen. Brefeld, (1) der bereits mit einer Reinkultur des Endomyces arbeitete, gibt an, in „gärfähigen Lösungen" eine alkoholische Gärung nicht gefunden zu haben:

„Die stets von neuem untergetauchten Kahmhäute aus Oidien, die sich immer wieder an der Oberfläche ansammelten, erregten selbst in dieser Anhäufung keine Gärung, auch in der Masse des Sediments nicht, welches sich schließlich am Boden der Nährlösung angesammelt hatte." Leider sucht man vergebens nach einer genauen Angabe über die Zusammensetzung dieser „gärfähigen Lösungen", über die Art der Versuchsanstellung und der nachherigen Prüfung auf Alkohol. Im weiteren Verlauf seiner Untersuchungen kam er zu dem Ergebnis, daß die lebhafte Gärung in den Schleimflüssen durch die den Endomyces begleitenden Hefen hervorgerufen werde. Hansen (1) konnte aber auch bei diesem eine zwar schwache aber deutliche Gärung wahrnehmen. Er sah in einem Würzekolben bei 25° bis 27° C nach einem Tag schon deutliche Gärung, dann eine starke, blasige, mehlartig, weißliche Haut, stellenweise gelblich bis bräunlich, nach elf Tagen konnte er mit dem Ebullioskop 0,75 Vol.-pCt. Alkohol, nach 22 Monaten 1,4 Vol.-pCt. nachweisen. In 10 pCt. Dextrose-Hefewasser nach 14 Tagen 3,4 Vol.-pCt. Gleichzeitig trat kräftige Ätherbildung ein. Holtz bestimmte in vergorener Würze einmal nach vier Tagen die gebildete CO_2 (nach Meißel) und berechnete daraus den Alkohol zu 0,56 Gew.-pCt. Ferner bestimmte er ihn pyknometrisch durch Destillation, was bei Zimmertemperatur nach zwei Tagen 0,52 Gew.-pCt. und bei 30° 0,63 Gew.-pCt. ergab.

Aus eigenen Beobachtungen ist hierzu zu bemerken: Der Endomyces läßt sich allerdings besonders bei tiefer Temperatur (17 bis 20° C) und schwacher Impfung besonders von Oidien der Kahmhaut ziemlich lange fortpflanzen, ohne daß Gärungserscheinungen auftreten. Impft man aber einigermaßen viel, am besten von einer frischen Kultur in Würze, so zeigt sich schon bei Zimmertemperatur, besser noch bei 28—30° nach eins bis zwei Tagen deutliche Gasentwicklung. Dabei macht sich ein kräftiger Geruch nach Quitten bemerkbar. In der Flüssigkeit treten große Mycelflocken auf, die durch die Kohlensäure an die Oberfläche gehoben werden und hier eine lockere, gelbliche 1½ cm dicke Decke bilden, vom Aussehen loser, durchtränkter Watte. Darüber bildet sich oft, aber nicht regelmäßig ein ganz feines weißes Häutchen, das nur aus fettreichen Oidien besteht. Nach Beendigung der Hauptgärung sinkt die dicke Decke allmählich zu Boden, das Häutchen aus Oidien bleibt aber dauernd an der Oberfläche. Es ist mehr oder weniger fest zusammenhängend, nicht benetzbar und unmöglich unterzutauchen, was bei dem großen

Fettgehalt leicht erklärlich ist: das vergorene Bier schmeckt noch ziemlich süß, etwas pappig und aromatisch, aber nicht gerade unangenehm. Die Reaktion der Flüssigkeit ist neutral oder eine Spur sauer. Gärversuche in größerem Maßstabe wurden mit den sechs isolierten Stämmen angestellt. Das Verhalten war im wesentlichen das gleiche, verwandt wurde gehopfte Bierwürze von 11,3 pCt. Balling, und zwar je 500 ccm. Das Material wurde von Riesenkolonien erst auf kleine Fläschchen, nach 24 Stunden auf 100 ccm Flaschen, die alle mit der gleichen Würze beschickt waren, geimpft und deren Inhalt nach drei Tagen im Stadium kräftigster Gärung auf die großen Flaschen übergegossen. Die Versuche standen bei Zimmertemperatur also ungefähr 20° C. Nach zwölf Tagen wurde durch Destillation und pyknometrische Wägungen des Destillats ein Alkoholgehalt von 0,2—0,3 Gew.-pCt. festgestellt. Nach genaueren Studium der Wachstumsbedingungen des Pilzes wurde der Versuch unter optimalen Bedingungen wiederholt. Es wurde 20 pCt. Balling ungehopfte Würze verwandt und die Gärung 14 Tage bei 30° durchgeführt. Es wurde dann 1. durch pyknometrische Wägungen der Extraktgehalt der Würze vor der Gärung und nach der Gärung und nach dem Verdunsten des Alkohols festgestellt, und daraus mit Hilfe der von W. Windisch berechneten Alkoholfaktoren die zu erwartende Alkoholproduktion zu 1,14 pCt. berechnet und 2. durch Destillation der gewonnene Alkohol direkt pyknometrisch zu 0,90 pCt. festgestellt. Die so erhaltene Differenz von 0,24 pCt., die unmöglich allein auf Veratmung zurückzuführen ist, dürfte durch Bildung der flüchtigen Ester zu erklären sein. Zum Vergleich mit den Angaben Hansens wurde noch ein Gärversuch in Hefewasser mit Zusatz von 9 pCt. Dextrose angesetzt und bei 30° zehn Tage der Gärung überlassen. Es wurde dann wiederum der Alkoholgehalt sowohl aus dem Extraktverlust berechnet als durch Destillation bestimmt. Es ergaben sich im ersten Falle 3,4 pCt., im zweiten Falle 2,56 pCt. Bei der Gärung trat ein ganz besonders starker Geruch nach Fruchtäther auf.

Eine tabellarische Zusammenstellung aller über die Gärwirkung des Endomyces bis jetzt vorliegenden Angaben ist in Anlage II beigegeben. Wie man daraus ersieht, stimmen die Resultate verhältnismäßig recht gut überein, wenn man bedenkt, wie viele Faktoren die vorliegenden Zahlen beeinflußt haben. Es sei nur auf die große Verschiedenheit der verwandten Würzen und des Hefewassers hingewiesen und auf den ebenfalls nicht geringen Einfluß, den der physiologische Zustand des Impfmaterials in jedem Fall ausgeübt haben mag.[1]) Ein

1) Eine Zusammenfassung aller darüber vorliegenden Arbeiten von Lange: Wochenschr. f. Brauerei 1906, Nr. 32—39.

erheblich abweichendes Resultat bekam danach nur Brefeld, dessen Versuche aber, wie gesagt, mangels genügender Angaben nicht nachgeprüft werden konnten.

c) Assimilation von Zuckerarten.

Die Assimilierbarkeit von Zuckerarten wurde von Beijerink zuerst vermittels der auxanographischen Methode untersucht; auf Grund der erhaltenen Auxanogramme nahm er damals eine Gruppierung der Hefen vor, indem er den Namen der von den betreffenden Hefen am besten als C-Quelle ausgenutzten Zucker in den Namen der Gruppe legte. Später wurde die Methode, allerdings erheblich modifiziert, von Lindner (M. B. S. 281) angewandt zur Prüfung des Verhaltens der Hefe gegenüber ihren stickstoffhaltigen Selbstverdauungsprodukten. Etwa in der gleichen Form wandte ich die Methode an, um bei dem Endomyces Magnusii die Assimilation der Zuckerarten festzustellen. Es wurde ein Nährboden hergestellt, bestehend aus Leitungswasser, 12 pCt. Gelatine und Hayduckscher mineralischer Nährlösung ($MgSO_4$ — K_2HPO_4). Von der Zugabe einer besonderen Stickstoffquelle wurde abgesehen. Mit dieser Gelatine wurden unter Zugabe von 10 pCt. der verschiedenen Zuckerarten Petrischalen ausgegossen und eine Aufschlämmung der zu untersuchenden Pilze in Wasser mit einem Pinsel in einzelnen Strichen aufgetragen. Untersucht wurden eine der von mir isolierten und von Claussen und Guillermond übersandten Kulturen. Die Versuche standen bei Zimmertemperatur, die Resultate wurden nach 14 Tagen aufgenommen. Sie waren insofern wenig befriedigend, als in allen Fällen schon allein durch die in der Gelatine enthaltenen Nährstoffe ein allerdings geringes Wachstum eingetreten war. Ein besonders üppiges Wachstum zeigte sich bei den Zuckerarten, die vergoren werden können, also Dextrose, Fruktose (Mannose nicht geprüft), Rohrzucker und Raffinose, schwach dagegen auf Galaktose. Außerdem sehr üppig auf Mannit, der ja bekanntlich besonders für die höheren Pilze eine sehr geeignete C-Quelle darstellt und von ihnen als Reservestoff aufgespeichert wird.[1])

Genauere Resultate ergab ein Versuch, der folgenderweise angestellt war: Es wurde eine Lösung bereitet von $MgSO_4$ 0,025 pCt. und K_2HPO_4 0,025 pCt. und Asparagin 0,2 pCt. in destilliertem Wasser. Von dieser Lösung wurden je 10 ccm auf kleine Fläschchen gegeben und diesen die verschiedenen Kohlenstoffquellen zugesetzt, und zwar die Zucker, Glukoside und Alkohole zu 10 Gew.-pCt. (Glyzerin Vol.-pCt.), die orga-

1) Vgl. Zapek, Biochemie der Pflanzen 1905, Bd. I, S. 242.

nischen Salze und Säuren zu 1 pCt. der kristallisierten Substanz. Geimpft wurde mit einem Tropfen einer Aufschlämmung des Pilzes in Wasser, dann standen die Versuche 10 Tage bei 28° C.

Es folgen die einzelnen Resultate:

(Die Wachstumsintensität ist mit Zahlen von 1 bis 3 bezeichnet. 1 = schwach, 2 = mäßig, 3 = normal.)

10 pCt.	Arabinose	0	Eine Spur staubiger Bodensatz.
10 „	Xylose		
10 „	Dextrose	1+	Wenig und ziemlich staubiger Bodensatz, ziemlich große Oidien, und Hefeformen mit wenig Plasma und großen Vakuolen.
10 „	Fruktose	1+	Ganz rein flockiger Bodensatz, normales Mycel in mäßiger Entwicklung, dazwischen auch Hefeformen, diese aber in Klumpen zusammengeballt.
10 „	Galaktose	1—	Geringer staubiger Bodensatz.
10 „	Laktose	0	Gar nicht.
10 „	Maltose	2+	Ziemlich reichlich flockiger Bodensatz, überwiegend Mycel, daneben Hefeformen, beides weniger groß wie bei Dextrose. Die Hefeformen zeigen in ihrer Vermehrung alle Übergänge zwischen Spaltung und Sprossung.
10 „	Raffinose	2—	Ähnlich wie bei Maltose, aber weniger üppig.
10 „	Inulin	0	Eine Spur gewachsen.
10 „	Rhamnose	0	
10 „	α-Methyl-Glukosid	1	Wenig Hefeformen.
10 „	β-Methyl-Glukosid	1	Wenig Hefeformen.
10 „	Glyzerin	1—	Sehr geringer staubiger Bodensatz, Hefeformen.
10 „	Mannit	1—	Sehr geringer staubiger Bodensatz, Hefeformen.
10 „	Dulcit	0	
10 „	Quercit	0	

Auf den organischen Salzen trat nur auf Na-Azetat ein sehr geringes Wachstum ein, auf den anderen wie auf den Säuren keine Spur. Geprüft wurden noch:

1 pCt. NH_4-oxalat,	1 pCt. Na-azetat,
1 „ Seignette-Salz,	1 „ NH_4-tartrat,
1 „ Ca-Succinat,	1 „ Ca-laktat,
1 „ NH_4-zitrat,	1 „ saures apfelsaures Ca,
1 „ Zitronensäure,	1 „ Apfelsäure,
1 „ Bernsteinsäure,	1 „ Malonsäure.

Die Versuche mußten zuerst unbefriedigend erscheinen, da auf allen Hexosen nur ein sehr schwaches Wachstum eingetreten war, wo man doch üppigste Entwicklung erwarten sollte. Es bestätigte sich aber in vielen verschiedenen Versuchen, daß Dextrose nicht als C-Quelle dienen kann. Um so mehr mußte das andere Resultat erstaunen, daß auf Maltose ein recht gutes Wachstum eingetreten war. Diese Verhältnisse sollen aber erst im letzten Abschnitt im Zusammenhang mit dem Kontrollversuch besprochen werden.

d) Assimilation von Eiweiß.

Ähnlich diesem letzten Versuch über die Zuckerassimilation wurde auch in Anlehnung an die gleichen Versuche Lindners und Stockhausens die Assimilierbarkeit stickstoffhaltiger Substanzen geprüft. Es wurden die Nährsalze verwandt wie oben ($Mg\,SO_4$ 0,025, $K_2\,HPO_4$ 0,025), und trotz schlechter Resultate in den Vorversuchen doch Dextrose als C-Quelle, weil die Ergebnisse von den Zuckerassimilationsversuchen noch nicht vorlagen. Ganz schlechtes Wachstum wurde festgestellt, wenn Nitrate oder NH_4-Salze als Stickstoffquelle gegeben wurden, es war aber doch zu hoffen, daß bei leichter assimilierbarer Stickstoffnahrung mit Dextrose gute Resultate erhalten werden könnten.

Die verwandten Chemikalien waren: Pepton (Witte), Asparagin (Kahlbaum); die übrigen Eiweißkörper wurden seinerzeit als Selbstverdauungsprodukte der Hefe von Prof. Kutscher (Marburg) isoliert und dem Laboratorium zu den Assimilationsversuchen von Lindner und Stockhausen zur Verfügung gestellt. Es waren dies:

Asparaginsäure,	Hypoxantin,
Arginin,	Adenin,
Guanidin hydrochlorid	Tyrosin,
Leuzin,	Phenylalanin
Thymin,	Urazil,
Lysin.	

Die Lösungen werden derart hergerichtet, daß einer Lösung der Mineralsalze und 8 pCt. Dextrose die verschiedenen Eiweißkörper zu 0,2 pCt. zugegeben wurden. Es möge hier die kurze Feststellung genügen,

daß in fast allen Versuchen nur ganz spärliches Wachstum eintrat. Eine einzige Ausnahme machte nur Arginin, bei dem zwar auch kein üppiges aber doch immerhin ein unverkennbar stärkeres Wachstum zu erkennen war. Bei allen übrigen Körpern war es nur spurenweise und ohne Besonderheiten in der Ausbildung der Mycel- bzw. Hefeformen zu zeigen. Es scheint also doch noch eine geeignetere C-Quelle zum normalen Wachstum nötig zu sein.

e) Zusammenfassung der Resultate.

Wie gesagt, war das wichtigste Resultat der Zuckerassimilationsversuche, daß von allen untersuchten Zuckerarten sich nur Maltose als geeignete C-Quelle erwies. Durch die Kleingärversuche war wiederholt und unzweideutig nachgewiesen, daß Maltose nicht vergoren werden kann, es war auch bei dem Assimilationsversuch in dem Fläschchen keine Spur von Gärung zu bemerken. Es lag also die Vermutung nahe, daß Maltose ungespalten, jedenfalls ohne hydrolytische Spaltung in Hexosen assimiliert werde. Man könnte ja vielleicht einwenden, daß vor dem Aufbau intrazellular eine Spaltung eintrete. Ein ähnlicher Fall ist sogar bekannt: die Orangehefe aus Mazun (Kalanthar) und einige andere vermögen Rohrzucker zu invertieren, aber können ihn nicht vergären, weil ihnen das Gärungsenzym, die Zymase fehlt. Diese Hefen vergären dann aber überhaupt keine Zuckerarten, und da, wie gesagt, der Endomyces Magnusii Hexosen recht kräftig vergärt, müßten doch auch die Spaltungsprodukte der Maltose der Gärung anheimfallen. Es ist also im vorliegenden Falle eine hydrolytische Spaltung der Maltose vor der Assimilation auch intrazellular nicht denkbar. Die Möglichkeit einer Spaltung in andere Produkte als die Hexosen bleibt dadurch natürlich unberührt. Der exakte experimentelle Beweis dafür müßte allerdings mit dem Preßsaft des Pilzes gebracht werden.

Analoga für Assimilation von Disacchariden ohne vorherige Hydrolyse sind nicht gerade sehr selten; so ist z. B. für Schimmelpilze ein Fall von Hans Pringsheim[1]) beschrieben. Er fand, „daß Schimmelpilze Disaccharide als C-Quelle auszunützen imstande sind, trotzdem sie keine diese Zucker spaltende Enzyme absondern. . . . Sie stehen in der Ausnutzung nicht hydrolysierter Kohlehydrate somit im Gegensatz zu höheren tierischen Organismen. Auf welche Weise der Angriff der Pilze auf das ungespaltene Zuckermolekül erfolgt, ist bisher nicht geprüft worden. Verschiedene der von uns untersuchten Pilze wurden auf Rohrzuckerlösung herangezogen und enthielten doch keine Invertase, so

1) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiologische Chemie, Bd. 62, S. 374.

Rhizopus, Muc. javanicus und drei Penicilliumarten. Muc. corymbifer züchteten wir auf Laktose, in seinem Preßsaft fanden wir aber keine Laktase."

Auch bei Hefen läßt sich diese Erscheinung zuweilen feststellen. So zeigen z. B. die roten Hefen aus der Sammlung des Instituts ganz regelmäßig die Erscheinung, daß sie bei ihrem Wachstum fast die ganze Würze aufzehren, ohne daß eine Gasentwicklung stattfindet. Beijerink konnte bei seinen Zuckerassimilationsversuchen beobachten, daß S. ellipsoideus, S. Pastorianus Rees und S. fragans Rohrzucker assimilieren, ohne ihn zu invertieren.

Bei weitem auffallender war der Umstand, daß die Hexosen für die Assimilation nicht geeignet erschienen. Da dieser Fall in der Literatur meines Wissens ganz vereinzelt dasteht, war natürlich eine sehr genaue Nachprüfung erforderlich. Es liegt aber eine so große Zahl von übereinstimmenden Ergebnissen vor, daß mir die Tatsache einwandfrei nachgewiesen erscheint. Nachdem die ersten Vorversuche mit einer Nährlösung aus Asparagin und Dextrose fehlgeschlagen waren, wurden sie in den mannigfaltigsten Variationen wiederholt: Als N-Quelle wurden Asparagin, Pepton, NH_4-salze (Sulfat und phosphat) Nitrate und Nitrite gegeben; als Nährsalze wurden angewandt: K_2HPO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$ die in Konzentration von je 0,05 und 0,25 pCt. und in verschiedenen Kombinationen:

1. K_2HPO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$,
2. K_2HPO_4, $MgSO_4$,
3. K_2HPO_4, $CaCl_2$, zugegeben wurden.

Dextrose wurde zu 10 und 20 pCt. gereicht. Auch der ganze Versuch über die Eiweißassimilation ist als eine Bestätigung aufzufassen und als eine Erweiterung insofern, als danach feststeht, daß die N-Quelle auf die Dextroseassimilation ohne Einfluß ist.

Als einziges Analogon zu diesem Verhalten wäre vielleicht S. thermantitonum anzuführen. Nach Johnson gibt diese Hefe in reinen Malzwürzen keine normale Gärung, wohl aber bei Anwesenheit größerer Dextrinmengen und am besten bei Zusatz von 5 pCt. Rohrzucker[1]). Möglicherweise spielt hier das höhermolekulare Dextrin eine ähnliche Rolle wie die Maltose bei Endomyces Magnusii; auch in dem Verhalten gegen Rohrzucker ließe sich vielleicht eine Ähnlichkeit finden; da aber exakte Versuche noch nicht vorliegen, läßt sich darüber natürlich nichts mit einiger Bestimmtheit sagen.

1) Vgl. Lindner, M. B. S. 437.

Nun stand es aber zweifellos fest, daß der Pilz Dextrose zu vergären vermag, wenn er genügend gut wächst; dafür hatte den deutlichsten Beweis der Gärversuch in Dextrose-Hefewasser geliefert, bei dem 2,5 pCt. Alkohol erzeugt wurden. Es lag nun natürlich sehr nahe, nachdem einmal in Maltose eine zur Assimilation geeignete C-Quelle gefunden war, die Richtigkeit obiger Behauptungen in einem Versuch zu prüfen, bei dem gleichzeitig Maltose zur Assimilation und Dextrose zur Vergärung gegeben wurde. Um gleichzeitig eine Vorstellung von dem geeignetsten Mengenverhältnis zu bekommen, wurden die Zucker in verschiedenen Lösungen in verschiedenen Quantitäten zugegeben; gleichzeitig wurden als Kontrollversuche einmal nur Dextrose und einmal nur Maltose gegeben; in allen Fällen betrug die Summe der zugegebenen Zucker 10 Gew. pCt.; die Grundlösung bestand aus K_2HPO_4 0,025 pCt., $Mg\,SO_4$ 0,025 pCt. und Asparagin 0,2 pCt. in destilliertem Wasser. Alle Versuche wurden gleichzeitig angestellt, und zwar mit je 300 ccm der Lösungen in 2 l-Flaschen. Die Impfung geschah bei allen gleichmäßig durch 0,5 ccm einer und derselben Aufschlämmung des Pilzes in destilliertem Wasser, und nachdem sie zehn Tage lang im Thermostaten bei 27° C gehalten waren, wurden an einem Tage bei allen Versuchen der gebildete Alkohol durch Destillation und pyknometrische Wägung bestimmt. Die Versuchsbedingungen waren also ganz genau die gleichen. Die einzelnen Versuche und ihre Resultate sind aus der Tabelle zu ersehen:

Versuch	Zucker		Alkohol
1.	Dextrose 10 pCt.	Maltose —	0,21 pCt.
2.	„ 9 pCt.	„ 1 pCt.	0,70 pCt.
3.	„ 5 pCt.	„ 5 pCt.	1,28 pCt.
4.	„ 1 pCt.	„ 9 pCt.	0,26 pCt.
5.	„ —	„ 10 pCt.	0,05 pCt.

Das Aussehen der Versuche war wie erwartet: bei 1 nur wenig und feinstaubiger Bodensatz, meist aus großen Oidien bestehend, und keine Spur von Gärung; bei 2 am dritten Tag eine ganz geringe Gasentwicklung und etwas reichlicher und flockiger Bodensatz; bei 3 während der ganzen Versuchsdauer täglich beim Aufschütteln kräftiges Aufschäumen, ziemlich reichlicher flockiger Bodensatz und auch eine geringe Deckenbildung; bei 4 und 5 keine Spur von Gärung, aber besonders bei 5 ein sehr reichlicher Bodensatz von Mycelflocken.

Der Versuch bestätigte also vollkommen die Annahme daß Dextrose zwar vergoren, aber nicht assimiliert werden kann, — also ausschließlich als zymotische Nahrung — und Maltose zum Aufbau geeignet ist, aber

nicht vergoren wird, — also ausschließlich als genetische Nahrung benutzt wird. Fehlt die erstere, so findet zwar gutes Wachstum aber keine Gärung statt; fehlt aber letztere, so ist infolge zu geringer Vermehrung des Pilzes auch nur eine unverhältnismäßig geringe Alkoholproduktion möglich, es sei denn, daß der Pilz in solchen Mengen zugegeben wird, daß er nicht mehr zu wachsen braucht, wie dies bei den Kleingärversuchen der Fall war. Für das zur größtmöglichen Alkoholproduktion nötige Mengenverhältnis der beiden Zucker ergibt sich aus den gefundenen Alkoholzahlen, daß quantitativ mehr Dextrose zur Gärung als Maltose zur Assimilation nötig ist. Der Alkoholgehalt in Versuch 3 erscheint durchaus normal, sowohl im Verhältnis zu Versuch 4 und 5 (das Verhältnis der Alkoholzahlen dieser Versuche entspricht etwa dem ihres Gehaltes an Dextrose) als auch zu dem Versuch mit Dextrose-Hefewasser. In Versuch 2 ist aber offenbar schon durch Mangel an Maltose lange nicht alle Dextrose vergoren worden. Ein Optimum dürfte demnach zwischen Versuch 2 und 3, also etwa bei $\frac{1}{3}$ Maltose und $\frac{2}{3}$ Dextrose liegen.

Durch welche Faktoren im Dextrose-Hefewasser das gute Wachstum und damit die kräftige Gärung hervorgerufen wird, läßt sich natürlich nicht mit Bestimmtheit angeben, da ja die chemische Zusammensetzung des Hefewassers nicht zur Genüge bekannt ist. Wollte man nach einer darin enthaltenen C-Quelle fragen, so könnte man als solche das sicher sehr reichlich vorhandene Glykogen nennen. Das würde mit den vorliegenden Versuchen insofern übereinstimmen, als Kohl (S. 83) angibt, daß, „soweit unsere mangelhaften Kenntnisse ein Urteil erlauben, die Glykogenase neben Maltose und Isomaltose Erythro- und Achroodextrin zu bilden scheint". Aber es ist ja auch möglich, daß die darin in ziemlich großen Mengen vorhandenen Eiweißkörper als kombinierte C- und N-Quelle gedient haben. Ähnlich sind auch die Zuckerassimilationsversuche auf Gelatineplatten zu beurteilen, wo in der Gelatine eine ganze Reihe chemisch unbekannter Körper eingeführt worden ist.

Das Resultat also: Der Pilz kann unter den angegebenen Verhältnissen von den untersuchten Zuckerarten nur Maltose zum Aufbau verwenden, ohne sie jedoch spalten und vergären zu können. Andere Zuckerarten, insbesondere Hexosen können nicht dieselben Dienste tun, da ihm ja Maltase fehlt und folglich eine Kondensation von Glukose, die durch revertierende Wirkung dieses Enzyms stattfinden müßte, nicht möglich ist.

Ein Hinweis auf den grundsätzlichen Unterschied zwischen den Vorgängen bei der Gärung und der Assimilation: das eine nur möglich für Hexosen, so daß Di- und Polysaccharide, wenn nicht vorher hydrolysiert, unberührt bleiben; im anderen Fall gerade umgekehrt: die Hexose ist

unbrauchbar, weil das Enzym zu ihrer Kondensation fehlt; das Disaccharid wird ungespalten assimiliert. Es wäre sicher von größtem Interesse, festzustellen, ob sich ähnliche Verhältnisse auch bei anderen Pilzen finden und ich möchte glauben, daß die angewandten Methoden einen gangbaren Weg darstellen: 1. die Kleingärmethode, 2. die Assimilationsversuche, 3. als Bestätigung die Kultur in Nährlösung mit gesonderter genetischer und zymotischer C-Nahrung und quantitativer Bestimmung des gebildeten Alkohols. Als eine wichtige Ergänzung der Ergebnisse wären dann allerdings noch die entsprechenden Versuche mit den Preßsäften der Pilze heranzuziehen.

2. Einfluß verschiedener Gifte auf das Wachstum.

Da zur Zeit der Anstellung des Versuches eine geeignete physiologische Nährlösung noch nicht bekannt war, mußte, um überhaupt ein Wachstum zu ermöglichen, mit Würze als Grundlösung gearbeitet werden. Der Nachteil, daß sie ihrer chemischen Zusammensetzung nach nicht genau bekannt war, erschien aber doch nur gering, weil anzunehmen war, daß spezifische Giftwirkungen der zugegebenen Substanzen trotzdem unverändert eintreten würden.

Die Lösungen wurden also hergestellt mit ungehopfter Würze von 9 pCt. Balling, die in kleinen Fläschchen jedesmal mit der Lösung der betreffenden Substanz auf 10 ccm aufgefüllt wurden. Die Berechnung der Konzentration geschah im allgemeinen nach Gewichtsprozenten der kristallisierten Substanz. Ausnahmen davon: $NaOH$ und H_2SO_4: nach Volumprozent $^1/_{10}$ norm.: Essigsäure: Volumprozent Eisessig: Paraldehyd: Volumprozent der Flüssigkeit; Alkohol: 96 pCt. nach Volumeinheiten verdünnt.

Die Impfung geschah gleichmäßig durch einen Tropfen der Aufschlämmung des Pilzes in Wasser. Die Fläschchen standen bei 28—30° im Thermostaten. Nach 24 Stunden wurden von sämtlichen Fläschchen Tröpfchenkulturen angelegt und bei gleicher Temperatur aufgestellt. Die Beobachtung der Fläschchen geschah nach zwei Tagen, zehn bis zwölf Tagen und bei einzelnen später noch einmal. In der Tabelle ist, wo nichts anderes bemerkt, der Zustand nach zehn bis zwölf Tagen, also nach der normalen Beendigung des Wachstums angegeben. Die Reaktion der Flüssigkeit ist ebenfalls in diesen Tagen, also nach Beendigung des Versuches, festgestellt. Für das Wachstum sind wieder die Zahlen 1—3 angewandt, wobei 3 dem Wachstum auf Würze ohne jeden Zusatz entspricht.

$NaOH$

10 pCt. Spur alkalisch, 3+
Dicke Decke, mehr Bodensatz wie in Würze allein, alle Formen vorhanden; Mycel besonders reich verzweigt und lang.

5 „ Spur alkalisch, 3+
Etwas Haut, reichlich Bodensatz. Mycel besonders üppig.

2 „ Neutral, 3
Normal, wenig Haut. Einige sehr große Mycelflocken.

Na_2CO_3

1 pCt. Stark alkalisch, 1+
Würze dunkel gefärbt, wenig und staubiger Bodensatz, wenigzellige, sternförmige Zellverbände, nicht zerfallen. Nach vier Wochen sehr reichlich kleine Mycelflocken, reichliches Mycel mit Gemmen.

0,5 „ Stark alkalisch, 2—
Würze dunkel gefärbt; Flocken, kaum verzweigte, lange Mycelfäden, büschelartig, strahlig von einem Punkt ausgehend; gar kein Zerfall der Hyphen.

0,2 „ Stark alkalisch, 3
Würze entfärbt; eine Spur Haut, sehr reichlich Bodensatz, normale Formen.

Alaun

1 pCt. Reagiert neutral, 0
Nicht gewachsen.

0,05 „ Reagiert neutral, 0
Nicht gewachsen.

0,02 „ Reagiert schwach sauer, 3
Dicke Decke von Mycel zu Boden gesunken, darunter Bodensatz von Mycel und Oidien.

$K_2Cr_2O_7$

0,5 pCt. 0,25 pCt. 0,1 pCt. 0,05 pCt.
Nicht gewachsen.

0,025 „ 0
Spur gewachsen.

0,01 „ Reagiert neutral, 1
Bodensatz: sehr kleine Mycelflocken; Mycel sehr kurzgliedrig, kurz, aber reich verzweigt, wenig Plasma, keine Oidien, wenig Zerfall.

$K\,MnO_4$

0,5 „ Spur alkalisch, 2
Nach zwei Tagen Niederschlag von Braunstein, Würze vollständig entfärbt; auf dem Niederschlag große weiße Mycelflocken, später meist Spalthefeformen. Wenig Kahmhaut.

0,25 „ Neutral, 3 —
Niederschlag ebenso. Ziemlich dicke Kahmhaut, reichlich Mycel und Oidien, normale Formen.

0,1 „ Spur sauer, 3
Normal, viel Bodensatz, keine Kahmhaut.

$Zn\,SO_4$

1—0,2 pCt. Nicht gewachsen.

$Mg\,SO_4$

1 pCt. Neutral, 3 +
Dicke blasige Haut aus fettreichen Oidien, viel Bodensatz, flockig, sehr reich verzweigtes Mycel.

0,5 „ Neutral, 3
Üppiges Mycel, viel Zerfall, keine Haut.

0,2 „ Schwach sauer, 3
Ebenso.

$Fe\,SO_4$ (starker Niederschlag)

1 pCt. Neutral, 2 —
Wenig Mycel und Oidien.

0,5 „ Neutral, 2 +
Besser, normale Formen.

0,2 „ Neutral, 2 +
Ebenso.

Eisenalaun (starker Niederschlag)

1—0,5 pCt. Nicht gewachsen.

0,2 „ 2 —
Bodensatz Mycel in Zerfall, Oidien mit kleinkörnigem Plasma.

$Co\,(NO_3)_2$

1 pCt. 0,5 pCt. Nicht gewachsen.

0,2 „ Reagiert sauer, 2 —
Flockiger Satz, nur Mycel, eigentümlich gedrungene Formen, kurze Verzweigungen, gleichmäßiges Plasma, kein Zerfall.

$NiSO_4$

1—0,2 pCt. Nicht gewachsen.

$Cd(NO_3)$ (starker Niederschlag)

1—0,2 pCt. Nicht gewachsen.

$CuSO_4$

1—0,1 „ 0

0,05 pCt. Spur sauer, 1+

Wenig, sehr kurze verkümmerte Mycelflocken, wenig Plasma, keine Oidien.

0,02 „ Spur sauer, 3

Dicke Haut, reichlich Bodensatz, kurzes, verkümmertes Mycel, Zerfall in Spalthefen. Haut: Oidien mit wenig Plasma. Nach vier Wochen ist bei diesen Oidien die äußere dicke Membran verquollen und zum Teil abgestreift.

Bleiazetat (Niederschlag)

1—0,5 pCt. Nicht gewachsen.

0,2 „ 1+

Etwas Mycel in Zerfall, Oidien mit Fetttropfen.

Urannitrat (Niederschlag)

1—0,2 pCt. Nicht gewachsen.

K-Arsenit

1—0,1 pCt. Nicht gewachsen.

0,05 „ Neutral, 1

Etwas staubiger Bodensatz, wenigzellige Gebilde, einzelne Zellen riesig angeschwollen.

0,02 „ Spur sauer, 2

Ziemlich viel Bodensatz, normales Mycel, dazwischen einige tote Riesenzellen, etwas Zerfall. Riesenzellen 20—25 μ Durchmesser.

Sublimat

0,01 pCt. Nicht.

0,003 „ Neutral, 2—

Bodensatz staubig, wenig kleine Flocken. Normale Formen, Oidien und Mycel in Zerfall, langsamer gewachsen.

0,001 „ Neutral, 3—

Wenig Haut, Oidien mit Fetttröpfchen, normal.

0,0002 „ Neutral, 3—

Ebenso, viel Oidien mit reichlichen Fetttröpfchen.

H_2SO_4

1 pCt. Sauer, 2—
Wenig Bodensatz, normales Aussehen.

0,5 „ Sauer, 3—
Normal, etwas flockiger Bodensatz, ziemlich viel Mycel.

0,2 „ Sauer, 3
Normal, eine Spur Gärung.

Essigsäure

5—1 pCt. Nicht gewachsen.

0,5 „ Sauer, 1
Wenig gewachsen, einige große lange Mycelien.

0,2 „ Sauer, 3
Dicke Haut mit großen Blasen, Bodensatz staubig und einzelne Flocken, normal.

Oxalsäure

1—0,2 pCt. Nicht gewachsen.

Weinsäure

1 pCt. Sauer, 1
Am dritten Tag: Bodensatz ziemlich flockig; in der Tröpfchenkultur längliche Konidien; später Oidien mit Fetttröpfchen und Mycel in Zerfall, Tröpfchenkultur, ganz inhaltsleere Oidien.

0,5 „ Sauer, 2—
Staubiger Bodensatz, einige Flocken und etwas Haut, später fettreiche Oidien und Mycel in Zerfall.

0,2 „ Sauer, 3—
Staubiger Bodensatz, Flocken, Haut, später Oidien mit Fetttröpfchen, keine Gärung.

Zitronensäure

1 pCt. Sauer, 3
Reichlich schleimiger, fadenziehender Bodensatz, fast reines Mycel, Dicke normal, bis 2 cm lange Fäden ziehend, Plasma meist koaguliert.

0,5 „ Sauer, 3+
Dicke Decke aus fettreichen Oidien, mehr Bodensatz, meist Flocken, fast reines Mycel. Optimum.

0,2 „ Sauer, 3
Am zweiten Tag wenig Haut; später zu Boden gesunken, weniger Bodensatz, Mycel sehr lang, wenig Spalthefen und Oidien.

Tannin (starker Niederschlag)

1—0,5 pCt. Nicht gewachsen.

0,2 „ 1+

Wenig gewachsen, etwas Spalthefeformen und Oidien mit Fetttropfen.

Phenol

0,1 pCt. Sauer, 2+

Anfangs sehr langsam gewachsen, später am Boden große, leichte Flocken, nur Mycel, wenig längliche Konidien. Nur in Tröpfchenkultur Oidien. Plasma körnig, Mycelfäden sehr stark, bis 12,5 μ Durchmesser.

0,05 „ Sauer, 3—

Anfangs nur flockiger Bodensatz, sehr viel sehr kräftiges Mycel, später auch Spalthefeformen und wenig Oidien mit Fett. In Tröpfchenkultur auffallend kurzgliedriges Mycel; Zellen kürzer als der Durchmesser der Fäden.

0,02 „ Sauer, 3+

Rascher und reichlicher flockiger Bodensatz und Trübung. Am dritten Tage etwas Haut, Mycel noch üppiger in großen Flocken (bis 3 mm Durchmesser). Viel Oidien mit sehr viel Fetttröpfchen, vereinzelt Gemmen.

Paraldehyd

2 pCt. Nicht gewachsen, 0

1,5 „ Spur gewachsen, 0

1 „ Sauer, 3

Dicke Haut, staubiger Bodensatz und einzelne sehr schöne und große Flocken.

0,5 „ Ebenso, 3

0,2 „ Ebenso, 3

Alkohol

9,6 pCt. Nicht gewachsen, 0

4,8 „ Spur sauer, 2

Starker Äthergeruch, ziemlich viel Bodensatz, staubig, etwas mäßig langes Mycel mit homogenem Plasma, Oidien mit Fetttröpfchen, Spalthefeformen, keine Gärung.

1,9 „ Spur sauer, 3

Äthergeruch, viel Bodensatz, etwas flockig, zweiten Tag etwas Gärung und Haut, normale Formen.

Würze (ungehopft, hell, 9 pCt. Bllg.)
Ohne Zusatz. Reagiert sauer, 3
Kräftig vermehrt, zweiten Tag sehr deutliche Gärung, etwas Haut, Bodensatz teils staubig und teils fadenziehend, schleimig, Oidien und Mycel in Zerfall. Mycel 5—10 μ dick.

Die Reduktion von $KMnO_4$ zu Braunstein ließ auf die Bildung von Hydrogenase schließen. Um darüber Klarheit zu gewinnen, wurden die von Grüß angegebenen Reaktionen auf Hydrogenase ausgeführt. Es wurde Würze mit ganz wenig Methylenblau grünlich gefärbt, eine Reduktion des Farbstoffs und Entfärbung trat jedoch nicht ein. Ferner wurde Würze mit Schwefelpulver versetzt; es trat lebhafte Gärung ein mit starkem Geruch nach Fruchtäther und H_2S, welch letzterer durch Bleiazetat zweifellos nachgewiesen wurde. Die letzte Reaktion ist ein deutlicher Beweis für die Entwicklung von Wasserstoff. Bei dem Versuch mit Methylenblau war eine Gärung nicht zu beobachten: es ist anzunehmen, daß die Tätigkeit der Enzyme durch die Giftwirkung des Farbstoffes aufgehoben wurde. Die Vermehrung war aber bei geringem Farbzusatz ungeschwächt und zeigte normale Formen.

Interessant war es ferner, daß es möglich wurde, durch gewisse Giftzusätze ziemlich reines Mycel in größeren Mengen zu erhalten, so daß damit die Versuche auf Gipsblöcken (S. 16) mit geeigneterem Material wiederholt werden konnten. Es wurden zu diesem Zweck die geeignetsten Giftzusätze zu 100 ccm Würze hinzugegeben, und zwar wurden die besten Erfolge erzielt mit Soda 0,5 pCt. und Zitronensäure 1 pCt.

Weitere Besonderheiten in Aussehen und Wachstum des Pilzes haben sich bei diesem Versuch nicht eingestellt.

3. Einfluß der Temperatur auf das Wachstum.

Der Einfluß verschiedener Temperaturen auf die Entwicklung wurde festgestellt, indem Kulturen des Pilzes in Würzefläschchen, sowohl wie im hängenden Tröpfchen in den Fächern des Panumschen Thermostaten bei den betreffenden Temperaturen aufgestellt wurden. Eine Zusammenstellung der Versuche in Tabelle III. Das Optimum für das Wachstum liegt etwa bei 25—28°, für die Gärung bei 28—30°. In Tröpfenchenkulturen zeigen sich bei dieser Temperatur fast ausnahmslos Spaltheferformen. In Würzefläschchen entsteht rasch lebhafte Gärung, eine Decke aus Myceiflocken und reichlicher Bodensatz. Bei 18—20° überwiegt im Tröpfchen die Bildung eines ziemlich dünnen Mycels, das mit fallender Temperatur immer langsamer in Oidien zerfällt.

In Würzeflaschen ist wesentlich weniger, etwas schleimiger und festsitzender Bodensatz. Die Wachstumsgrenze nach unten liegt zwischen 7 und 10° C. Bei Kulturen über dem Optimum tritt die Mycelbildung ganz zurück. Im Tröpfchen entwickeln sich höchstens drei bis vierzellige Gebilde, die in einem Fall (Abb. 14) bei 38° sehr eigentümliche pyramidenförmige Kolonien bildeten. Wachstumsgrenze nach oben etwa bei 40° C.

Zusammenfassung.

1. Es wird behauptet, daß der von Hansen und Holtz als Oidium Ludwigii beschriebene Pilz mit dem Endomyces Magnusii identisch ist, und ein ausreichender Grund zu dieser neuen Benennung in dem Ausbleiben der Fruktifikation nicht zu finden ist.
2. In der Umgegend von Berlin konnte der typische weiße Eichenschleimfluß in sechs Fällen gefunden werden, und jedesmal war daraus der Endomyces Magnusii zu isolieren.
3. Die Fruktifikation konnte nicht aufgefunden werden. Die Identifikation des Pilzes geschah durch Vergleich mit der von Guillermond übersandten Kultur.
4. Es kommt neben der bekannten endogenen Oidienbildung, die Holtz mit Recht als Durchwachsung erklärt, auch Bildung von Oidien innerhalb des Mycelfadens — von Chlamydosporen — vor.
5. Der Pilz vermag Dextrose, Fruktose, Mannose, Rohrzucker und Raffinose zu vergären. Von diesen Zuckerarten ist keine als zur Assimilation geeignete C-Quelle zu bezeichnen. Gutes Wachstum war von den untersuchten Zuckern nur durch Maltose zu erreichen, obwohl diese nicht vergoren wird. Um also normale Gärung in physiologischer Nährlösung zu erzielen, muß Maltose als genetische neben Dextrose als zymotischer Nahrung gereicht werden.
6. Danach wird die für die Ernährungsphysiologie meines Wissens neue Behauptung aufgestellt:
   Es wurde ein Fall gefunden, in dem ein nicht vergärbares Disaccharid als C-Quelle zur Assimilation dient, während vergärbare Hexosen als C-Nahrung ungeeignet sind.

Andere Organismen aus Eichenschleimflüssen.

Bei der Untersuchung der Schleimflußvegetationen wurde neben dem Endomyces noch eine ganze Reihe anderer Organismen gefunden, von denen aber natürlich nur ein kleiner Teil genauer untersucht werden konnte. Es waren dies einige Hefen, die, nach der Häufigkeit ihres Auftretens zu schließen, auch als ziemlich regelmäßige Bestandteile der Schleimflußvegetationen zu bezeichnen waren. Außerdem, wie nicht anders zu erwarten, eine Anzahl Organismen, deren Auftreten wohl als ein mehr zufälliges bezeichnet werden kann, und die deshalb auch weniger Interesse boten.

1. Apiculatus-Hefen. (Hefen H, I, W.)

Mit ziemlicher Regelmäßigkeit war in den Proben das Auftreten von Apiculatus-Hefen zu beobachten. Aus zwei Proben aus dem Grunewald und einer, die aus Ostpreußen übersandt war, wurde eine Apiculatus-Hefe isoliert; die drei Stämme verhielten sich bei allen Versuchen gleich. Sie waren in Würze sehr schwer zu kultivieren, auf Zusatz von Dextrose wurde dann etwas besseres Wachstum erzielt. Die zitronenförmigen Zellen maßen $3\frac{1}{2}$—$4\frac{1}{2}$ = 7—9 μ. Eine Gärung war in Würze nicht zu bemerken, die Hefe bildete einen auffallend festen Bodensatz. Durch die Mikrogärversuche wurde gefunden, daß die Hefe nur Dextrose und Fruktose zu vergären im Stande ist; dies stimmt überein mit den Apiculatus-Hefen der Berliner Sammlung Nr. 606, 697, 698, (von Dr. Rommel). Sporenbildung konnte weder auf Gipsblöcken bei Temperaturen zwischen 20 und 30° noch in Tröpfchenkulturen in Wasser herbeigeführt werden, obwohl die Versuche über drei Wochen ausgedehnt wurden.

Der von Ludwig als regelmäßiger Begleiter des Endomyces beschriebene S. Ludwigii Hansen, mit dem diese Hefen zwar in der Form einige Ähnlichkeit haben, aber wegen ihres ganz anderen Verhaltens in bezug auf Sporenbildung und Gärwirkung (vgl. Tabelle 1) bestimmt nicht identifiziert werden dürfen, konnte aus Berliner Schleimflußvegetationen in keinem Fall isoliert werden. Dagegen war es in einigen Fällen möglich, ihn in Greizer Material aufzufinden und zu photographieren.

2. Sporenbildende Hefen. Hefen T. u. V.

Hefen, die sich durch besonders großes Sporenbildungsvermögen auszeichneten, wurden von Lindner bereits aus dem Schleimfluß einer Eiche im Tiergarten isoliert, ihr Verhalten gegen Zuckerarten

geprüft, (vgl. Tabelle I.: Hefen Nr. 689, 690, 691) und in einigen Fällen photographiert. („Atlas" Tafel 68 „Dewa" und „Diabas".)

Eine von mir in zwei Fällen isolierte Hefe konnte mit der von Lindner isolierten Nr. 689 indentifiziert werden. Sie wurde einmal in Material aufgefunden, das Herr Prof. Ludwig aus Greiz übersandt hatte (T.), und einmal aus einer Probe, die ich aus Ostpreußen zugeschickt bekam (V.)

Die Zellen sind im Stadium starken Wachstums elliptisch, 3—4 = 5—7 μ, später runden sie sich ab, und haben dann einen Durchmesser bis zu 5,5 μ. In Würze erregt die Hefe rasch ziemlich lebhafte Gärung und zeigt dabei ausgesprochen untergärigen Charakter. Das Verhalten gegen Zuckerarten zeigt Tabelle I, es ist übereinstimmend mit den von Lindner über Nr. 689 vorliegenden Angaben. Am auffallendsten war an der Hefe die Leichtigkeit, mit der sie zur Sporenbildung zu bringen war. In Tröpfchenkulturen in Würze wurden regelmäßig nach Beendigung des Wachstums in kürzester Zeit von fast allen Zellen Sporen angelegt, und zwar zwei bis vier, in der Regel vier Sporen in der Zelle (Abb. 28). Auf Gipsblöcken ist das Optimum für die Sporenbildung bei 25° C.

3. Zygosaccharomyces-ähnliche Hefen. (Hefen E. und F.)

An zwei Eichen im Grunewald wurde eine Hefe gefunden, die durch Bildung von Kopulationsfortsätzen sehr charakteristisch ist.

Die Hefe hat Torulaform, 3½—4½ μ Durchmesser, auf Würze ziemlich gutes Wachstum, aber keine Gärung. Nach der Kleingärmethode wurde festgestellt, daß sie Glukose, Fruktose, Mannose und Rohrzucker stark vergärt, mäßig stark Raffinose, Trehalose und Inulin. Die ziemlich flachen Riesenkolonien auf Würzegelatine zeigen fast regelmäßig nach einiger Zeit kleine warzenförmige Gebilde, die oft flach, mit 2—3 mm Durchmesser, manchmal auch halbkugelförmig ausgebildet werden. Sporen wurden in etwa 25—50 pCt. der Zellen auf Gipsblöcken bei 25° C. nach drei Tagen angelegt; hier sowohl wie in Tröpfchen-Kulturen in destilliertem Wasser, besonders aber in den Warzen der Riesenkolonien, zeigten kräftige Zellen keimschlauchartige Ausstülpungen, die etwa ¼ bis ⅓ des Zelldurchmessers an Dicke, und über das Doppelte an Länge erreichten. Weniger häufig, aber zweifellos deutlich, war zu beobachten, daß zwei Zellen durch einen solchen Schlauch verbunden waren. Es schien aber nach den vorliegenden Bildern weniger wahrscheinlich, daß hier eine Kopulation gleichwertiger Zellen vorlag, als daß die plasmaleere, offenbar abgestorbene Mutterzelle ihren Inhalt in den Schlauch vorgeschoben und sich hier am Ende eine kleinere Tochter-

zelle gebildet hat. Zweifellos ist, daß die Schläuche immer nur einer Zelle angehörten; eine Querwandbildung in der Mitte oder sonst irgend welche Anzeichen, daß hier die Schläuche zweier Zellen verschmolzen, konnte niemals beobachtet werden. Sporen sind in der Regel in gewöhnlichen Zellen gefunden worden, gelegentlich auch in Zellen mit einem Kopulationsfortsatz, nie in zwei verbundenen Zellen. Vielmehr war hier meistens eine Zelle tot und plasmaleer und das Plasma zu der kleineren Zelle hinübergewandert, oder es befand sich in dem Schlauch zwischen beiden. Die Bildungen erinnern lebhaft an die Zeichnungen von Klöckers Schwanniomyces occidentalis, wo auch häufig längliche „keulenähnliche Sprosse", besonders an den sporenbildenden Zellen, dagegen keine Kopulation beobachtet werden konnte; und an den ebenfalls von Klöcker beschriebenen De Baryomyces globosus, der solche Fortsätze auch als Verbindung zweier sporenbildender Zellen zeigte, so daß Klöcker hier eine Verschmelzung zweier Zellen zu sehen glaubte. (1)

Auch im Eichenschleimfluß ist eine solche Hefe schon einmal von Lindner beobachtet worden. In dem „Atlas" ist in dem Bild „Gideon" (Abb. 29) eine Hefe abgebildet, die ganz ähnliche Hyphenansätze zeigt: sie ist hier als „sporenbildende Torula, vielleicht identisch mit S. Delbrücki" bezeichnet. Die Hefe war seinerzeit nicht isoliert worden; bei vergleichenden Versuchen mit S. Delbrücki konnte aber wiederholt beobachtet werden, daß er ganz dieselben Ansätze bildet. Die Hefen konnten aber weder mit dieser, noch mit den auch zum Vergleich herangezogenen Zygosaccharomycesarten identifiziert werden. Schon in der Kleingärmethode zeigten sich, wie ein Blick auf die Tabelle I bestätigt, bedeutende Unterschiede. Schon wahrscheinlicher ist es, daß in dem von Lindner aufgenommenen Bild derselbe Organismus vorgelegen hat. Er wäre dann in drei Fällen im gärenden weißen Eichenschleimfluß gefunden und demnach wohl auch als ziemlich regelmäßiger Bestandteil solcher Vegetationen zu bezeichnen.

Nach dem Obengesagten liegt also zwar ein Vertreter der Gattung Zygosaccharomyces nicht vor; die Spezies ist aber vielleicht als ein sehr interessantes Zwischenglied zwischen dieser und der Gattung Saccharomyces aufzufassen, indem bei ihr die Kopulationsfortsätze zwar noch ausgebildet werden, aber bereits funktionslos geworden sind.

4. Torula-Hefen. (Hefen A und B).

Von den Torula-Hefen, die sicher ebenso wie die anderen Arten sehr häufig und in einer großen Zahl von Unterarten und Varietäten

vorkommen, wurden zwei Stämme isoliert. Sie waren von Aussehen ganz gleich, runde Zellen bis zu 5 μ Durchmesser, und verhielten sich in Würze wie eine untergärige Hefe. Ein Unterschied zeigte sich nur bei den Kleingärversuchen im Verhalten gegen Inulin, und zwar ganz unzweideutig bei viermaliger Wiederholung des Versuches mit verschiedenen Kulturen.

Auch von den von Lindner früher isolierten Torula-Hefen sind diese beiden im Verhalten gegen Zuckerarten verschieden.

Zwei Kahmhefen und eine sehr kleine, durch Mycelbildung sehr charakteristische Hefe wurden nicht weiter untersucht.

Aus Greizer Material wurde ferner noch das Dematium pullulans isoliert. Es wurde von Herrn v. Hielmcrone mit dem in der Berliner Sammlung vorhandenen verglichen, ohne daß irgend welche Besonderheiten aufgefunden worden wären.

5. Prototheca Zopfii Krüger.

Ein Organismus, der durch seine eigentümliche Vermehrungsweise auffiel, wurde noch in Greizer Material aufgefunden. Durch die freundliche Unterstützung von Herrn Prof. Ludwig gelang es mir leicht, ihr als die von Krüger beschriebene Prototheca Zopfii zu bestimmen. Bei den zahlreichen damit angestellten Versuchen bestätigten sich die von Krüger[1]) über diesen Pilz gemachten Angaben vollkommen, so daß dieser sehr eingehenden Arbeit eigentlich nichts mehr hinzuzufügen ist. Als einzige Ergänzung sei hier nur auf die beigefügten Photographien (Abb. 30, 31) verwiesen.

Sämtliche in der Arbeit genannte Kulturen sind unter der angegebenen Bezeichnung der Hefensammlung des Instituts für Gärungsgewerbe übergeben worden.

Die Arbeit wurde im Botanischen Laboratorium des Instituts für Gärungsgewerbe auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. P. Lindner ausgeführt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, ihm auch an dieser Stelle für vielerlei Anregung und Unterstützung bei der Arbeit meinen verbindlichsten Dank auszusprechen. Ferner bin ich den Herren Prof. Dr. Ludwig, Prof. Guillermond und Dr. Clauẞen für die Überlassung von Material und Kulturen sowie für manche Anregung zu großem Dank verpflichtet.

1) Beiträge zur Physiol. und Morph. nied. Organ. von W. Zopf, Heft 4, 1894, S. 69.

Literatur.

Abkürzungen: W. f. B. = Wochenschrift für Brauerei, Berlin, Parey.
C. f. B. = Zentralblatt für Bakteriologie.

Beijerink.

1. C. f. B. XVI 1894, S. 50.
2. C. f. B. IV, 1898, S. 211 (Leuconostoc).

Brefeld, O.

1. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie. Münster i. W. Heft IX, 1891.

Guilliermond.

1. C. rend. d. l'Acad. d. sciences Paris 1909, 15. 4. 09.
2. C. f. B. II. Abt. 1909 Nr. 18/22, S. 480 (Systematik).

Hansen.

1. C. f. B. V. 632, 1898.
2. Annales d. Micrographie T. II, Nr. 5, S. 214, 1890.
3. Compte rendu d. Lab. de Carlsberg 1891, 3, 44.
4. Botan. Ztg. 1892, Nr. 19.
5. C. f. B. 1904, 12, 529 (Systematik).

Holtz, W.

1. C. f. B. VII, 1901, S. 113 usw.

Klöcker, A.

1. Compte rendu de Carlsberg, 1909, VII, S. 267, 273.

Kohl, F. G.

H. — Die Hefepilze; Quelle und Meyer, Leipzig 1908.

Lindner, Paul.

M. B. — Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. Parey, Berlin, 5. Auflage 1909.
Atlas der mikroskopischen Grundlagen der Gärungskunde. Parey 1903.

1. W. f. B. 1900, S. 336 (vgl. M. B. S. 275).
2. W. f. B. 1900 Nr. 49/51 (vgl. M. B. S. 278).
3. Ber. Bot. Ges. V., 1887, S. 153.

Ludwig, F., Hofrat Prof. Dr., Greiz.

1. Ber. d. dtsch. botan. Ges. 1886. Generalvers., S. XVII.
2. Tageblatt d. Naturforscher u. Ärzte, Berlin 1886.
3. Hedwigia 1886, H. V.

4. Verhandlung d. Bot. Ver. d. Prov. Brandenburg 1886.
5. Der Naturwiſſenſchaftler 1887, Nr. 1. (Über Rhabditis dryophila).
6. C. f. B. 1888, IV, S. 323.
7. C. f. B. 1888, IV, S. 453 (Torula monilioides).
8. C. f. B. 1889, VI, S. 134, 162 (gegen Hanſen).
9. Dtſch. bot. Monatsſchrift 1890, VIII, Nr. 5 und 6 (Inſekten).
10. Deutſch bot. Monatsſchrift 1890, VIII, Nr. 9 und 10.
11. C. f. B. 1890, VIII, S. 424 (Gummifluß der Eiche).
12. Wiſſenſchaftl. Rundſchau der Münchener N. N. 1890, S. 425.
13. C. f. B. 1891, X, S. 10 (Endomyces vernalis).
14. C. f. B. 1891, X, S. 214 (Fusarium aquaeductuum).
15. Lehrbuch der niederen Kryptogamen 1892.
16. Bot. Ztg. 1892, Nr. 48, S. 793 (Abscobolus Constantini).
17. Forſtl. Naturw. Zeitſchr. 1893, H. 1.
18. Forſtl. Naturw. Zeitſchr. 1894, S. 337.
19. Forſtl. Naturw. Zeitſchr. 1894, S. 523.
20. C. f. B. 1894, XVI, S. 58 (Gummoſe d. Hainbuchen).
21. C. f. B. 1894, XVI, S. 905 (Eomyces Crieanus).
22. Ber. d. dtſch. botan. Geſ. 1894, XII, S. 343 (Leuconoſtoc).
23. Naturw. Rundſchau 1895, X, S. 113 (Rhabditis; Eſſigfluß).
24. Hedwigia 1895, XXXIV (Leucocystis Criei).
25. Unſer Vogtland. 1895, II, S. 225.
26. C. f. B. 1896, II, S. 337 (Zuſammenſtellung).
27. Die Natur. 1898, S. 246.
28. Ber. d. Ver. d. Naturforſcher, Greiz, 1898, III, S. 11.
29. Leipzig. Illuſtrierte 1898 Juni 11.
30. Leipzig. Weinbörſe IV, Nr. 2, S. 38.
31. Zeitſchr. f. Pflanzenkrankh. 1899, Bd. IX, S. 10.
32. Prakt. Blätt. f. Pflanzenſchutz II, 1899, 12. Heft, S. 90.
33. Prakt. Blätter f. Pflanzenſchutz 1900, S. 5.
34. Mutter Erde 1900, Bd. IV, Heft 51/52. (Zuſammenſtellung über Sacch. Ludwigii).
35. C. f. B. 1901, VII, S. 350.
36. C. f. B. 1901, VII, S. 599 (gegen Holtz).

I. Gärtabelle.

	Arabinose	Xylose	Dextrose	Mannose	Galaktose	Fruktose	Sorbose	Glukoheptose	Rohrzucker	Maltose	Laktose	Melibiose	Trehalose	Raffinose	Inulin	Rhamnose	α Methyl-Glukosid	β Methyl-Glukosid	Mannit	Dulcit	Quercit	Erythrit	
Endomyces Magnusii . . .	0	0	**3**	**3**	?	**3**	—	0	**3**	0	0	0	0	**2**	0	0	0	0	0	0	0	0	Übereinstimmend meine 6 Stämme sowie die von Claussen und Guillermond.
Endomyces decipiens . . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—
Endomyces fibuliger . . .	0	0	**2**	**2**	**1**	**2**	0	0	**3**	0	**1**	0	0	**1**	?	0	**1**	0	—	—	—	—	Nach Lindner.
Endomyces javanensis . .	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—	Übereinstimmend mit Klöckers Angaben.
Endomyces capsularis . .	0	0	**3**	—	—	**3**	—	—	0	—	0	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—	—	Nach Lindner.
Sporenhefen T und V . .	0	0	**3**	**3**	**2**	**3**	—	0	**3**	**1**	0	?	0	**2**	0	0	**2**	0	0	0	0	0	Beide Hefen übereinstimmend, ebenso Hefe 689 der Sammlung.
Apiculatus-Hefen H, J, W	0	0	**3**	0	0	**3**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Übereinstimmend diese 3 Hefen sowie die 3 Apiculatus-Hefen der Sammlung Nr. 606, 697 und 698.
S. Ludwigii	0	0	**3**	**2**	**1**	**3**	0	0	**3**	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	Nach Lindner mit einer Kultur von Hansen.
Zygosacch. ähnliche Hefen E und F	0	0	**3**	**3**	0	**3**	0	0	**3**	0	0	0	**2**	**2**	**2**	0	0	0	0	0	0	0	Beide Hefen übereinstimmend.
Zygos. Barkeri	0	0	**3**	—	0	**3**	0	0	0	**3**	0	0	0	0	0	0	**2**	—	—	—	—	—	—
Sacch. Delbrücki	0	0	**2**	**2**	**1**	**2**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Nach Lindner.
toru'a A	0	0	**3**	**3**	0	**3**	0	0	**3**	**2**	0	?	**1**	**2**	**2**	0	**2**	**1**	0	0	0	0	Nur durch das Verhalten gegen Inulin unterschieden.
torula B	0	0	**3**	**3**	0	**3**	0	0	**3**	**3**	0	0	**1**	**2**	0	0	**2**	**1**	0	0	0	0	
690	0	0	**3**	**3**	**2**	**3**	0	0	**3**	0	0	0	0	**2**	**3**	0	**1**	0	—	—	—	—	Nach Lindner.
691	0	0	**3**	**3**	**3**	**3**	0	**2**	**3**	**2**	0	0	?	**1**	?	0	**2**	**2**	—	—	—	—	Nach Lindner.
Debaryomyces	0	0	**3**	—	0	**3**	0	0	**3**	0	0	0	0	**2**	**1**	0	0	0	—	—	—	—	Übereinstimmend mit Klöcker.
Schwanniomyces	0	0	**3**	—	0	**3**	0	0	**3**	?	0	0	0	**3**	**2**	0	0	0	—	—	—	—	Übereinstimmend mit Klöcker.

II. Übersicht über die mit Endomyces Magnusii angestellten Gärversuche.

Autoren	Nährlösung	Temperatur	Dauer	Resultat
Hansen	Würze	—	11 Tage	0,75 Vol.-pCt
"	"	—	22 Mon.	1,4 "
"	10 pCt. Dextrose-Hefewasser	—	14 Tage	3,4 "
Holtz	Würze	—	4 "	0,56 Gew.-pCt.
"	"	Zimmer	2 "	0,52 "
"	"	30°	2 "	0,63 "
Eigene Untersuchung	Würze, gehopft 11,3 pCt.	Zimmer	11 "	0,21—0,31 Gew.-pCt.
" "	Würze, ungehopft 20 pCt.	30°	14 "	0,90 Gew.-pCt. (1,14)
" "	9 pCt. Dextrose-Hefewasser	30°	8 "	2,56 " (3,4)
" "	Salze und Asparagin, 10 pCt. Dextrose	30°	9 "	0,21 pCt.
" "	Salze und Asparagin, 9 pCt. Dextrose, 1 pCt. Maltose	30°	9 "	0,70 "
" "	Salze und Asparagin, 5 pCt. Dextrose, 5 pCt. Maltose	30°	9 "	1,28 "
" "	Salze und Asparagin, 1 pCt. Dextrose, 9 pCt. Maltose	30°	9 "	0,26 "
" "	Salze und Asparagin, 10 pCt. Maltose	30°	9 "	0,05 "

III. Wachstum in Tröpfchenkulturen bei verschiedenen Temperaturen.

(Material von vier Wochen alter Gelatinekultur.)

Temperatur	I. Tag	II. Tag	III. Tag	IV. Tag
I. 56° } II. 45° } . . .	Plasma wird grobkörnig, dicke Membran gebildet.	Auftreten von Fetttropfen in den Oidien. Dauerzustand.	In Mycelteilen ist das Plasma geronnen.	—
III. 42°	Fetttropfen in den Oidien. Dauerzustand. Kein Wachstum.	—	An einem Mycelstück Chlamydosporen.	—
IV. 38°	—	—	Sehr kräftige, kegelförmige Kolonie, kurze 2—3 zellige kräftige Hypien, radial von einem Mittelpunkt aus gewachsen. (Abb. 14.)	Wenig gewachsen, Plasma geronnen, kräftige Pollutionen, sehr wenig Oidion vom Verbande gelöst.
V. 35°	Kaum gewachsen.	Mäßig vermehrt. Große wurst- und flaschenförmige Zellen, 3—4 zellig.	Pollutionen an mehrzelligen Gebilden.	Nährlösung erschöpft.
VI. 29°	2—3 zellige Spalthefeformen, stellenweise in Zerfall. Stark vermehrt.	Kräftig gewachsen, meist kleine runde Oidien mit großer Vakuole.	Zum Teil Querwandbildung in größeren Zellen. Wenig vermehrt.	Nährlösung erschöpft.
VII. 25°	wie VI.	Etwas stärkere Kolonien.	Wie VI.	Nährlösung erschöpft.
VIII. 21°	Lange und dünne Hyphen. 4—5 zellig.	Fast alles in Oidien zerfallen, kleiner, aber mehr wie VI und VII. Wenig Mycel noch.	—	Nur runde Oidien, stärker wie VII. Grobkörniges Plasma.
IX. 18°	Wenig schwächer, wie VIII.	Zerfall noch nicht so weit vorgeschritten wie bei VIII.	—	Stärker wie VIII. Weniger differenziales Plasma.
X. 14°	Minimal gewachsen.	An wenigen Stellen 2—3zellige Ausstülpung.	—	Sehr viel schwächer wie IX.
XI. 10°	Nicht gewachsen,	Ganz kleine Ausstülpung.	—	Einzelne lange, dünne Hyphen, 3—5 zellig.
XII. 7°	—	Kein Wachstum.	—	—

Lebenslauf.

Ich Ludwig Christian August Rose, evangelischer Konfession, bin am 15. März 1887 zu Frankfurt a. Main geboren als Sohn des Brauereibesitzers Christian Rose daselbst. Ich besuchte das Goethegymnasium in Frankfurt, das ich Ostern 1905 mit dem Zeugnis der Reife verließ. Bis Ostern 1906 arbeitete ich praktisch in mehreren Brauereien, im Sommersemester 1906 besuchte ich die Universität zu Würzburg. Herbst 1906 bis Herbst 1907 genügte ich meiner Dienstpflicht und studiere seit Michaelis 1907 in Berlin, wo ich an der Universität, der Landwirtschaftlichen Hochschule und an dem Institut für Gärungsgewerbe arbeitete. Die Promotionsprüfung bestand ich am 26. Mai 1910.